

**KONSERVIERTE GENE FÜR OBERFLÄCHEN-  
PROTEINE DER MIKROFILARIENSCHIED  
BEI DEN UNBESCHIEDENEN MIKROFILARIEN  
FREISETZENDEN ARTEN *ACANTHOCEILONEMA*  
*VITEAE* UND *ONCHOCERCA VOLVULUS***



**NIKOLA PANTCHEV**  
НИКОЛА ПАНЧЕВ

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Parasitologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

**Konservierte Gene für Oberflächenproteine der  
Mikrofilarienscheide bei den unbescheidete Mikrofilarien  
freisetzenden Arten *Acanthocheilonema viteae* und  
*Onchocerca volvulus***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
Beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**NIKOLA PANTCHEV**

Tierarzt aus Sofia

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. H. Zahner

PD Dr. P. Becher

Tag der Disputation: 21. August 2006

Meinen Eltern  
und Alex

НА МОИТЕ РОДИТЕЛИ  
И АЛЕКС

Teile dieser Dissertation wurden bereits auf Tagungen präsentiert:

HIRZMANN, J., PANTCHEV, N., DAFA'ALLA, T., GEYER, R., HINTZ, M., HOBOM, G., KASPER, M., TAUBERT, A., ZAHNER, H. (2001).

Molecular biology of eggshell and microfilarial sheath proteins.

Abstracts Conference on Filariasis, Hamburg, 15.

PANTCHEV, N., HIRZMANN, J., ZAHNER, H. (2002).

Search for homologues of the microfilarial sheath surface proteins Shp 3a and Shp 3 in the unsheathed filariae *Acanthocheilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*.

Abstracts Joint Ann. Meeting German Dutch Soc. Parasitol., Lübeck-Travemünde, 92-3.

## **ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	intestinale Kalbphosphatase
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMAE	N,N-dimethylaminoethanol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EB	Ethidiumbromid
Endkonz.	Endkonzentration
ES	exkretorisch-sekretorisch
EtOH	Ethanol
g	Gramm, Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
GuSCN	Guanidiniumisothiocyanat
h	Stunde
IAA	Isoamylalkohol
Ig	Immunglobulin
IgG, IgM, IgA	Immunglobuline der Klassen G, M und A
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
kB	Kilobasen und Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
λ	Phage Lambda
L1, L2 oder L3	Larve I, II oder III
LB	Luria Bertani
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight
MCS	Multiple Cloning Site
Mf(f)	Mikrofilarie(n)
2-ME	2-Mercaptoethanol
min	Minute
mM	millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NAc	N-Acetyl
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PC	Phosphorylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	Plaque Forming Unit

pH	negativer log der Hydroniumionenkonzentration
p.i.	post infectionem
RACE	rapid amplification of cDNA-ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (25°C), Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium Dodecylsulphate
s.c.	subkutan
Shp	Sheath protein (Scheidenprotein)
SL	Spleiss-, Leader'
SSC	Standard Saline Citrate
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan
Tween-80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U	Unit(s)
UV-Licht	Ultraviolette Licht
V	Volt
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

### Aminosäure-Nomenklatur

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

### Nukleotid-Nomenklatur

A	Adenin	H	A, T, C	S	G, C
B	G, T, C	K	G, T	T	Thymin
C	Cytosin	M	A, C	V	G, A, C
D	G, A, T	N	G, A, T, C	W	A, T
G	Guanin	R	A, G	Y	C, T

### Filarien

Av	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
Ov	<i>Onchocerca volvulus</i>
Ls	<i>Litomosoides sigmodontis</i>
Bm	<i>Brugia malayi</i>
Bp	<i>Brugia pahangi</i>



## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	14
<b>2.</b>	<b><u>Literaturübersicht</u></b>	17
<b>2.1</b>	<b>Biologie der Filarien</b>	17
<b>2.2</b>	<b><i>Onchocerca volvulus</i> und Onchocercose beim Menschen</b>	19
<b>2.3</b>	<b>Die Nagetierfilarie <i>Acanthocheilonema viteae</i> und ihre Verwendung in der experimentellen Filarienforschung</b>	22
<b>2.4</b>	<b>Entstehung, Struktur und Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide</b>	25
2.4.1	<u>Die Dichotomie bezüglich der Mikrofilarienscheide</u>	25
2.4.2	<u>Biochemische Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide</u>	29
2.4.3	<u>Die Proteine der Mikrofilarienscheide</u>	29
2.4.3.1	Die Hauptproteine der Mikrofilarienscheide	29
2.4.3.2	Weitere Proteine der Mikrofilarienscheide	34
<b>2.5</b>	<b>Die Persistenz der Mikrofilarien und Evasionsmechanismen</b>	35
<b>3.</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	38
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere und Parasiten</b>	38
3.1.1	<u><i>Mastomys coucha</i> und <i>Meriones unguiculatus</i>, ihre Haltung und Infektion mit <i>Acanthocheilonema viteae</i></u>	38
3.1.1.1	Haltung der Versuchstiere	38
3.1.1.2	Infektion der Versuchstiere	38
3.1.1.3	Blutentnahme und Bestimmung der Mikrofilariendichte	39
3.1.2	<u>Kaninchen</u>	40
3.1.2.1	Haltung	40
3.1.2.2	Blutentnahme	40
3.1.2.3	Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von Antiseren	40

3.1.3	<u>Serumgewinnung</u>	41
<b>3.2</b>	<b>Isolierung und Aufarbeitung von Parasitenstadien</b>	41
3.2.1	<u>Isolierung adulter <i>A. viteae</i></u>	41
3.2.2	<u>Isolierung von <i>A. viteae</i>-Mikrofilarien aus Blut</u>	42
3.2.3	<u>Einzelwurm-Segmente mit Isolierung der korrespondierenden Embryonalstadien, Wurmabschnitte sowie Gesamt-Embryonalstadien</u>	43
3.2.4	<u>Herstellung von Proteinhomogenaten (Antigen) aus <i>A. viteae</i></u>	45
<b>3.3</b>	<b>DNA und RNA</b>	46
3.3.1	<u>Isolierung genomischer DNA aus <i>A. viteae</i></u>	46
3.3.2	<u>Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. viteae</i></u>	47
3.3.3	<u>Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA</u>	48
3.3.4	<u>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</u>	48
3.3.4.1	Spaltung genomischer DNA mit <i>EcoRI</i>	49
3.3.4.2	Spaltungen und Dephosphorylierung von Plasmid-Vektoren	49
3.3.5	<u>Ligation einzelsträngig überhängender DNA-Enden</u>	52
3.3.6	<u>Sequenzierung und verwendete Oligonukleotide</u>	52
3.3.7	<u>Agarosegel-Elektrophorese</u>	55
3.3.8	<u>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen</u>	56
3.3.9	<u>Southern Blot-Analyse genomischer DNA</u>	56
3.3.10	<u>Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin-dUTP</u>	58
<b>3.4</b>	<b>Bakterien (<i>E. coli</i>)</b>	59
3.4.1	<u>Anzucht und Aufbewahrung</u>	59
3.4.2	<u>Herstellung kompetenter Zellen</u>	59
3.4.3	<u>Transformation</u>	60
3.4.4	<u>Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i></u>	61
3.4.4.1	Plasmid-Minipräparation zur Analyse rekombinanter Klone	61
3.4.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen	62
3.4.5	Herstellung von ‚Plating‘-Bakterien für die Amplifikation von Phagen	63

<b>3.5</b>	<b>Phagen (Bakteriophagen)</b>	64
3.5.1	<u>Titerbestimmung, Amplifikation und Aufbewahrung</u>	64
3.5.2	<u>Screening der genomischen Phagenbank von <i>A. viteae</i></u>	65
3.5.2.1	Ausplattieren der genomischen Bank	65
3.5.2.2	Transfer der Plaques auf eine Nylonmembran	65
3.5.2.3	Hybridisierung	66
3.5.2.4	Isolierung der positiven Klone	67
3.5.3	<u>Isolierung von Phagen-DNA nach Flüssig-Lyse</u>	68
<b>3.6</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	71
3.6.1	<u>Standard PCR und kritische Parameter</u>	71
3.6.2	<u>Klonierung von PCR-Fragmenten</u>	72
3.6.3	<u>Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden mittels der PCR-Technik</u>	72
3.6.4	<u>PCR-Analyse von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden</u>	73
3.6.5	<u>„Long Range“-PCR</u>	74
3.6.6	<u>RT-PCR</u>	75
<b>3.7</b>	<b>Expression der rekombinanten 6xHis-Proteine Av-Shp3a-1p und Av-Shp3a-12p</b>	76
3.7.1	<u>Klonierung in den Expressionsvektor pQE-30</u>	76
3.7.2	<u>Überprüfung der Expression rekombinanter Klone im Mikromassstab</u>	76
3.7.3	<u>Isolierung von Av-Shp3a-1p und Av-Shp3a-12p über Ni-NTA-Agarose-Säulen</u>	77
<b>3.8</b>	<b>Proteinanalytische Verfahren</b>	79
3.8.1	<u>Bestimmung der Proteinmenge</u>	79
3.8.2	<u>Dialyse von Proteinen</u>	79
3.8.3	<u>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung</u>	80
3.8.3.1	SDS-PAGE zur Auftrennung von Peptiden bis zu 1 kDa	82
3.8.4	<u>Bestimmung der relativen Molekulargewichte nach SDS-PAGE</u>	84
3.8.5	<u>Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen</u>	84
3.8.6	<u>Western-Blotting (Semi-Dry-Blotting)</u>	85
3.8.7	<u>Dot-Blotting</u>	86

<b>3.9</b>	<b>Immunnachweise</b>	87
3.9.1	<u>Immunoblot-Techniken</u>	87
3.9.1.1	Antikörpernachweis mit chromogenem Substrat (Immunfärbung)	87
3.9.1.2	Antikörpernachweis mit Chemilumineszenz-Substrat	88
3.9.2	<u>Mikrofilarien-Agglutinations-Assay (MAA)</u>	89
<b>3.10</b>	<b>Herstellung und Reinigung von Antikörpern und Konjugaten</b>	90
3.10.1	<u>Affinitätsreinigung von Antiseren</u>	90
3.10.2	<u>Herstellung eines Anti-<i>M. coucha</i> IgG-Peroxidase-Konjugates</u>	91
3.10.2.1	Isolierung von IgG aus Serum von <i>M. coucha</i>	91
3.10.2.2	Konjugation von Antikörpern mit Peroxidase	92
<b>3.11</b>	<b>Immunhistologie</b>	94
3.11.1	<u>Herstellung von Gewebeschnitten aus adulten <i>A. viteae</i> und Nachweis antigener Strukturen</u>	94
3.11.1.1	Paraffinschnitte	94
3.11.1.2	Kryoschnitte	96
<b>3.12</b>	<b>IIFT mit intakten, intrauterinen Embryonalstadien (Flotationsverfahren)</b>	96
<b>3.13</b>	<b>Computer-Programme zur Sequenz-Analyse und Internet URL-Adressen</b>	97
<b>3.14</b>	<b>Hinweise zu Sequenzvergleichen</b>	98
<b>4.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	99
<b>4.1</b>	<b><i>Av-shp3a</i></b>	99
4.1.1	<u>Bestätigung der Existenz von <i>Av-shp3a</i></u>	99
4.1.2	<u>cDNA und abgeleitete AS-Sequenz</u>	100
<b>4.2</b>	<b><i>Av-shp3</i></b>	103
4.2.1	<u>Versuch des Nachweises von <i>Av-shp3</i> über Kreuzhybridisierung und</u>	

<u>„Long Range“-PCR</u>	103
4.2.2 <u>Sequenz-Analyse des <i>Av-shp3</i>-Promotor-Bereiches</u>	106
4.2.3 <u>Genomische Southern Blot-Analyse von <i>Av-shp3</i> und Charakterisierung des <i>Av-shp3</i>-Gens</u>	108
<b>4.3 Organisation der genomischen <i>shp3a-shp3</i>-Region von <i>A. viteae</i></b>	111
4.3.1 <u>Orientierung von <i>shp3a/3</i></u>	111
4.3.2 <u>Vervollständigung der Sequenz des <i>shp3a-shp3</i>-Genomabschnitts von <i>A. viteae</i></u>	113
4.3.3 <u><i>Av-Intergen</i></u>	115
4.3.3.1 Transkription und Spleiss-Varianten	115
4.3.3.2 Homologie	118
<b>4.4 Orthologe Gene bei <i>O. volvulus</i></b>	121
4.4.1 <u><i>OvC29F5.1</i></u>	121
4.4.2 <u>Organisation des „intergenischen“ Abschnitts</u>	125
4.4.3 <u>„<i>shp3a</i>“</u>	125
<b>4.5 Homologievergleiche zwischen den verschiedenen Spezies (<i>B. malayi</i>, <i>L. sigmodontis</i>, <i>A. viteae</i> und <i>O. volvulus</i>)</b>	127
<b>4.6 Transkription des <i>Av-shp3a</i>-Gens in Parasitenstadien</b>	129
<b>4.7 Expression von <i>Av-Shp3a</i>-Peptiden und weitergehende Charakterisierung des Moleküls</b>	131
4.7.1 <u>Herstellung rekombinanter <i>Av-Shp3a</i>-Peptide und entsprechender Antisera</u>	131
4.7.2 <u>Charakterisierung der Antisera</u>	135
4.7.2.1 Abklärung der Kreuzreaktivität mit einem <i>Av</i> -24 kDa-Antigen	135
4.7.2.2 Darstellung von <i>Av-Shp3a</i> in <i>A. viteae</i> -Extrakten	140
4.7.3 <u>Versuch des Nachweises posttranslationaler Modifikationen von <i>Av-Shp3a</i></u>	143
4.7.4 <u>Versuch der immunhistologischen Darstellung von <i>Av-Shp3a</i></u>	144
4.7.5 <u>Versuch der Agglutination von Blutmikrofilarien durch Anti-<i>Av-Shp3a</i>-12p</u>	144

4.8	<b>Immunreaktionen gegen <i>Av-Shp3a</i> in infizierten <i>M. coucha</i></b>	145
5.	<b><u>Diskussion</u></b>	147
6.	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	161
7.	<b><u>Summary</u></b>	164
8.	<b><u>Anhang</u></b>	166
8.1	<b>Im Vorfeld dieser Arbeit sequenzierter, genomischer Bereich von <i>A. viteae</i> (<i>Av3a</i>; 1650 bp) mit dem orthologen <i>Av-shp3a</i>-Gen</b>	166
8.2	<b>Die Nukleotidsequenz des <i>shp3a-shp3</i>-Genomabschnittes von <i>Acanthocheilonema viteae</i></b>	168
8.3	<b>Die Nukleotidsequenz der von den Genen <i>OvC29F5.1</i> und <i>Ov-Intergen</i> flankierenden, genomischen Region von <i>Onchocerca volvulus</i></b>	171
9.	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	174

1.

**EINLEITUNG**

Filarien (Filarioidea: Nematoden) sind wichtige Krankheitserreger in den Subtropen und Tropen. Die grösste Bedeutung beim Menschen haben die Verursacher der lymphatischen Filariose, *Wuchereria bancrofti* und *Brugia* spp., die im gesamten tropischen Bereich der Erde bzw. im süd- und südostasiatischen Raum vorkommen sowie der Erreger der Flussblindheit in Afrika, auf der arabischen Halbinsel und in Mittelamerika, *Onchocerca volvulus*.

Die lymphatische Filariose tritt in mehr als 80 Ländern auf, und 1.2 Milliarden Menschen leben in endemischen Gebieten (WHO, 2000a). Gut ein Viertel von ihnen kann infiziert sein (DAS et al., 2000); die letzte Schätzung geht von 128 Millionen Infizierten aus. 90% der Infektionen verursacht *W. bancrofti*, 10% sind auf *B. malayi* und *B. timori* zurückzuführen. Die Onchocercose kommt in 36 Ländern vor, und 120 Millionen Menschen leben in endemischen Gebieten (96% davon in Afrika), wobei 18 Millionen davon infiziert sind (99% in Afrika; WHO, 2000b).

Die Filariosen verlaufen nicht letal, sondern führen zu chronischen Krankheitsformen wie Elephantiasis und massiver Hydrozele bei der lymphatischen Filariose oder Dermatitiden bei der Onchocercose, die ein Drittel der Infizierten betreffen. Die Onchocercose stellt darüber hinaus mit 270 000 bzw. 500 000 Fällen (WHO, 2000b) weltweit die zweitwichtigste infektiöse Ursache von Blindheit und Sehbehinderung und die lymphatische Filariose von dauerhafter Arbeitsunfähigkeit (WHO, 2000a). Dies hat grosse sozio-ökonomische Folgen für die betroffenen Regionen, die ohnehin zu den ärmsten der Welt gehören.

Die WHO lancierte ein globales Programm, um die Lymphatische Filariose bis 2020 zu eliminieren, wobei eine einmalige, jährliche Massen-Chemotherapie mit Diethylcarbamazin (DEC) oder Ivermectin in Kombination mit Albendazol empfohlen wurde (OTTESEN, 2000). Kontrollstrategien bei der Onchocercose zielen darauf ab, durch eine breit angelegte, jährliche Chemotherapie mit Ivermectin sowie durch eine Eindämmung von Kriebelmücken als Vektoren mit Hilfe von Insektiziden die Übertragung zu unterbrechen. Der Einsatz von Ivermectin besitzt insofern nur einen limitierenden Effekt, weil er die langlebenden adulten Würmer nicht beeinträchtigt und seine embryozide Wirkung sich hauptsächlich auf die späten Stadien der Mikrofilarienentwicklung beschränkt, ohne die frühe Embryogenese zu stören (PLAISIER et al., 1991). Studien, die Albendazol verwendeten, zeigten dass diese Substanz nur einen kurzen Effekt auf die frühe Embryogenese ausübt (AWADZI et al., 1995).

Seit den letzten Jahren wird außerdem die Behandlung mit Doxycyclin (über 6 Wochen) getestet. Durch dieses Antibiotikum wird bei adulten Weibchen durch Abtötung der

*Wolbachia*-Endobakterien die Embryogenese nachhaltig bis zu 24 Monate unterbrochen (Ivermectin allein blockiert die Embryogenese für 4 Monate) (HÖRAUF et al. 2003). Es eignet sich aber nicht für eine Massen-Chemotherapie, da es u.a. an schwangere und stillende Frauen und Kinder unter neun Jahren nicht verabreicht werden kann. Die systemische Behandlung mit DEC, das bei lymphatischen Filarien anders als Ivermectin neben einem mikrofilariziden Effekt auch eine gewisse Wirkung auf adulte Parasiten hat (SUBRAHMANYAM, 1987), ist mit Nebenwirkungen behaftet und wird deswegen bei der Onchocercose nicht eingesetzt (vgl. WHO, 1995). Zudem werden von den die Therapie überlebenden Adulten innerhalb weniger Monate wieder neue Mikrofilarien abgesetzt (GREENE et al., 1985b). Nach Therapie mit Ivermectin werden einerseits die Mikrofilarien bei wesentlich geringeren Nebenwirkungen abgetötet sowie andererseits bei den weiblichen Parasiten embryostatische Effekte erzielt (DARGE et al., 1991).

Das Fehlen eines Impfstoffes, der eine protektive Immunität verleiht und eine Reinfektion verhindert sowie die im Prinzip unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten mit Chemotherapeutika verlangen eine weitere Erforschung dieser Krankheiten und ihrer Ursachen. Dabei spielen die molekularen und immunologischen Mechanismen der Persistenz der Parasiten im Wirt eine Schlüsselrolle.

10.000 bis 20.000 Mikrofilarien werden bei *Loa loa* (EBERHARD et al., 1986) und *Litomosoides sigmodontis*, einer Nagerfilarie (MÖSSINGER et al., 1986), 700 bis 1500 bei *Onchocerca volvulus* (SCHULZ-KEY et al., 1990) während der Patenz täglich von einem einzigen Weibchen ausgeschieden. Bezogen auf die Grösse entspricht dies des Mehrfachen der Oberfläche eines adulten Parasiten. Es ist aber auffallend, dass bei infizierten Personen mit einer hohen Mikrofilariendichte im Blut keine oder nur eine stark verminderte filarienspezifische Immunantwort zu beobachten ist (OTTESEN et al., 1977; PIESENS et al., 1980; GALLIN et al., 1988).

Besonderes Kennzeichen der Mikrofilarien der lymphatischen Filarienarten des Menschen und einiger anderer tierspezifischer Arten, wie *L. sigmodontis*, ist eine sie umgebende Hülle, die Mikrofilarienscheide. Da sie eine Durchlässigkeit für Moleküle bis maximal 70 kDa besitzt (DEVANEY, 1985; ZAHNER et al., 1995) und somit für Antikörper nicht passierbar ist, stellt die Mikrofilarienscheide die eigentliche Interaktionsfläche mit dem Immunsystem des Wirtes dar. Parasitämische Wirte entwickeln eine stadienspezifische Immuntoleranz und bilden keine Antikörper gegen die Oberflächenproteine der Mikrofilarienscheide (MAIZELS & LAWRENCE, 1991; BARDEHLE et al., 1992a). Es war deswegen von besonderem Interesse diese Oberflächenmoleküle zu identifizieren und ihre Bedeutung in der



Immunevasionsstrategie der Parasiten zu analysieren. Die Hauptproteine der Mikrofilarienscheiden-Oberfläche von *L. sigmodontis*, Shp3 und Shp3a, und deren Orthologe bei dem Humanparasiten *B. malayi* und der Nagerfilarie *B. pahangi* konnten molekularbiologisch und bei *L. sigmodontis* auch biochemisch charakterisiert werden (HINTZ et al., 1994; HIRZMANN et al., 2002).

Nun besteht innerhalb der Familie Onchocercidae, der die wichtigsten Filarien angehören, insofern eine Dichotomie, dass neben Gattungen, deren Mikrofilarien bescheidet sind, auch solche auftreten, bei denen die Larven unbescheidet freigesetzt werden, so bei den Gattungen *Onchocerca*, *Acanthocheilonema* und *Dirofilaria* (vgl. ANDERSON, 2000). Es überraschte daher, dass im Vorfeld dieser Arbeit unter Verwendung von konservierten Primern durch PCR und RT-PCR ein *shp3a*-orthologes Gen bei *Acanthocheilonema viteae* amplifiziert werden konnte (HIRZMANN & ZAHNER, 2000). Nach Restriktionsspaltung, Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte konnte eine Sequenz von 1650 bp zusammengestellt werden, auf die zu Beginn dieser Arbeit zurückgegriffen werden konnte (vgl. Kapitel 8.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden das *shp3a*-Gen von *A. viteae* (*Av-shp3a*) und seine Expression auf der Basis der Vorversuche mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden charakterisiert. Vor allem wurde der Fragestellung nachgegangen, ob das Protein *Av-Shp3a* auch auf der Kutikula, d.h. auf der Oberfläche unbescheideter Larven 1, der Blutmikrofilarien, lokalisiert ist und bei der Immunevasion der Parasiten eine Rolle spielt. Desweiteren wurde untersucht, ob auch bei *A. viteae* ein nahe verwandtes zweites, bei *Brugia* spp. und *L. sigmodontis* beschriebenes, für Scheidenproteine kodierendes Gen – *shp3* – vorhanden ist, und ob die humanpathogene Filarie *O. volvulus*, die auch unbescheidete Mikrofilarien freisetzt, ebenfalls *shp3*- und *shp3a*-homologe Gene besitzt.

## 2.

## LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Biologie der Filarien

(u.a. aus OTTESEN, 1990; GREENE, 1990; MCMAHON & SIMONSEN, 1996)

Filarien sind parasitische, ovovivipare oder vivipare Nematoden aus der Superfamilie Filarioidea, die in die beiden Familien Filariidae und Onchocercidae eingeordnet werden (ANDERSON, 2000). Ihre Vertreter befallen als Endwirte außer Fischen alle Vertebraten. Als Zwischenwirte dienen blutsaugende Arthropoden. Mehrere Filarien sind von medizinischer oder veterinärmedizinischer Bedeutung. Die Tabelle 2-1 gibt eine Übersicht über die Merkmale und Krankheitssymptome der acht humanpathogenen Arten. In der Veterinärmedizin steht vor allem *Dirofilaria immitis*, die Filarie, die die ‚Herzwurmkrankheit‘ der Hunde hervorruft, im Vordergrund. Daneben kommen bei Einhufern und Wiederkäuern u.a. Filarien der Gattungen *Parafilaria* bzw. *Stephanofilaria* (sie verursachen die sog. Sommerwunden der Pferde und das ‚Sommerbluten‘ der Rinder) und *Setaria* (Adulte halten sich in der Peritonealhöhle und in inneren Organen auf) vor. Da Filarien i.d.R. sehr wirtsspezifisch sind, werden in der wissenschaftlichen Forschung häufig nagerspezifische Arten als Modellparasiten eingesetzt. Eine solche Modellfilarie ist die Baumwollrattenfilarie *Litomosoides sigmodontis* (u.a. LOK & ABRAHAM, 1992), die durch die tropische Milbenart *Ornithonyssus bacoti* übertragen wird. Diese Filarie kann im Labor außer im natürlichen Endwirt, der aus dem Süden der USA und aus Mittelamerika stammenden Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*), auch in verschiedenen anderen Nagetieren gehalten werden, z.B. in der Vielzitzenmaus *Mastomys coucha* (LÄMMLER et al., 1968). Auf einen weiteren Modellparasiten, der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, *Acanthocheilonema viteae*, wird ausführlich im Kapitel 2.3 eingegangen.

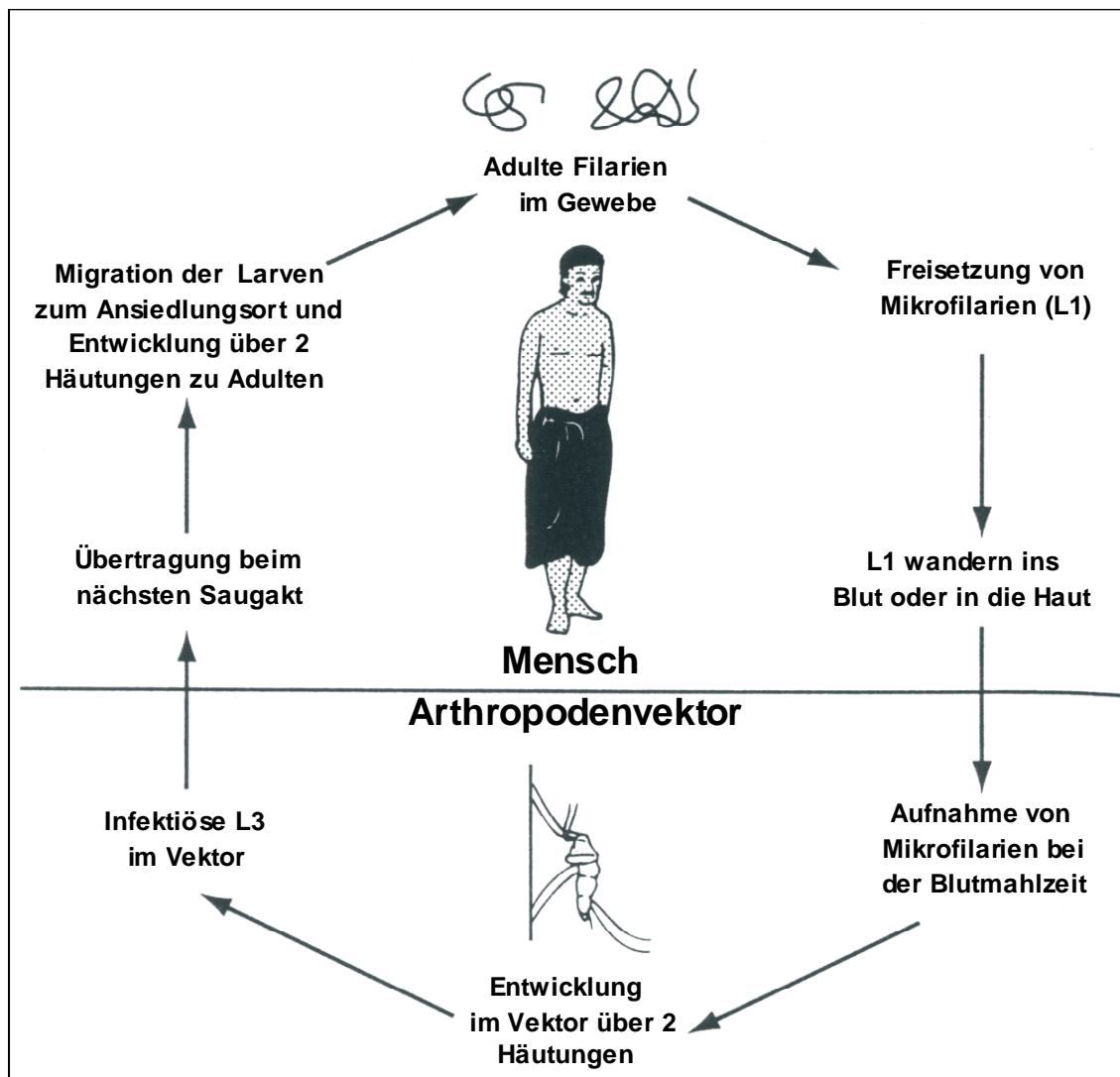
Alle Arten sind getrenntgeschlechtlich, wobei das Weibchen stets grösser als das Männchen ist (Länge *Brugia malayi*: ♀ 4-6 cm, Ø 0.2 mm, ♂ 2.5 cm, Ø 0.1 mm; *L. sigmodontis*: 6-12 cm, Ø 0.25 mm bzw. 2-2.5 cm, Ø 0.1 mm; *Wuchereria bancrofti*: 8-10 cm, Ø 0.3 mm bzw. 4 cm, Ø 0.1 mm und *Onchocerca volvulus*: 35-70 cm, Ø 0.4 mm bzw. 2-4 cm, Ø 0.2 mm). Die Adulten befinden sich je nach Art an verschiedenen Aufenthaltsorten im Wirt: in den Lymphgefässen und Sinus der Lymphknoten (*Brugia*-Arten und *W. bancrofti*), im Unterhautbindegewebe (*Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *Onchocerca* spp., *A. viteae*), in der Leibeshöhle, vor allem in Bauchhöhle und/oder Brustkorb (*M. ozzardi*, *M. perstans*, *L. sigmodontis*) oder in der Herzkammer und in grösseren Blutgefässen (*D. immitis*). Die

geschlechtsreifen Weibchen setzen je nach Spezies Eier oder täglich mehrere hundert bis mehrere tausend (vgl. Einleitung) als Mikrofilarien bezeichnete Larven 1 frei, die in Blutgefäße eindringen und mit dem peripheren Blutkreislauf zirkulieren oder in die Unterhaut und Haut einwandern. Die Mikrofilarien sind je nach Art zwischen 100-400 µm lange und 5-10 µm dicke Stadien.

**Tabelle 2-1: Merkmale der humanpathogenen Filarien und häufige klinische Symptome**  
(modifiziert nach MCMAHON & SIMONSEN, 1996)

Spezies	Verbreitung	Vektoren	Lokalisation Adulte	Lokalisation Mikrofilarien	Symptomatik
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Tropen	Moskitos	Lymphsystem	Blut	Hydrozele Lymphadenitis Elephantiasis
<i>Brugia malayi</i>	Ost- und Südost-Asien; Süd-Indien	Moskitos	Lymphsystem	Blut	Lymphadenitis Elephantiasis
<i>Brugia timori</i>	Indonesien	Moskitos	Lymphsystem	Blut	
<i>Loa loa</i>	West- und Zentral-Afrika	<i>Chrysops</i> spp. (Bremsen)	Bindegewebe	Blut	Kamerunbeule
<i>Mansonella perstans</i>	Afrika; Zentral- und Südamerika	<i>Culicoides</i> spp. (Gnitzen)	Leibeshöhlen seröse Häute	Blut	i.d.R. keine
<i>Mansonella streptocerca</i>	Zentral- und West-Afrika	<i>Culicoides</i> spp.	Haut	Haut	i.d.R. keine
<i>Mansonella ozzardi</i>	Zentral- und Süd-Amerika; Karibik	<i>Culicoides</i> spp. <i>Simulium</i> spp.	Bauchfellhöhle seröse Häute	Blut und Haut	i.d.R. keine
<i>Onchocerca volvulus</i>	Afrika; Jemen; Zentral- und Süd-Amerika	<i>Simulium</i> spp. (Kriebelmücken)	Haut	Haut Auge Lymphknoten	Dermatitis Blindheit Lymphadenitis

Die meisten Filariengattungen sind vivipar; nur einige Filarien bei Vögeln sind ovipar. Die Mikrofilarien entwickeln sich im Uterus innerhalb der Eihülle, die im distalen Uterus vor der Freisetzung verlassen wird (unbescheidete Mikrofilarien, z.B. bei den Gattungen *Mansonella*, *Onchocerca*, *Dirofilaria*, *Acanthocheilonema*), oder nach einer Umstrukturierung und Dehnung (Kapitel 2.4.1) bis zur Aufnahme durch den Zwischenwirt als extrakutikuläre Hülle, die sogenannte Mikrofilarienscheide, erhalten bleibt (bescheidete Mikrofilarien, z.B. bei den Gattungen *Brugia*, *Loa*, *Wuchereria*, *Litomosoides*). Der Lebenszyklus verläuft bei allen Arten prinzipiell gleich (Abb. 2-1). Die Mikrofilarien werden bei der Blutmahlzeit durch den Zwischenwirt aufgenommen, penetrieren die Darmwand und wandern in die Speicheldrüsen, Flugmuskeln oder andere Gewebe ein, wo sie sich meist innerhalb von 14 Tagen zweimal häuten und zu infektiösen Larven 3 entwickeln. Bei einer erneuten Blutmahlzeit wandern die L3 über die Mundwerkzeuge in den Stichkanal ein. Im Endwirt entwickeln sie sich über zwei Häutungen zu geschlechtsreifen Adulten. Entwicklungsdauer und Präpatenz sind artspezifisch unterschiedlich und erstrecken sich von ca. 50 Tagen (*A. viteae*, *L. sigmodontis*) bis zu 2 und mehr Jahren (z.B. *O. volvulus*).



**Abbildung 2-1: Lebenszyklus von Filarien**  
(modifiziert nach MCMAHON & SIMONSEN, 1996)

## 2.2 *Onchocerca volvulus* und Onchocercose beim Menschen

(u.a. aus GREENE, 1990; MCMAHON & SIMONSEN, 1996; WHO, 2000a)

Verursacher ist *O. volvulus*. Die Filarie wird in West-Afrika durch Kriebelmücken des *Simulium damnosum*-Komplexes übertragen; in Süd- und Zentralamerika sind die Überträger hauptsächlich *S. metallicum (avidum)*, *S. ochraceum* und *S. callidum (mooseri)*. In Guatemala sind z.B. 11% der Simulien natürlich infiziert. Obwohl es keine morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen geographischen Formen von *O. volvulus* gibt, existieren mindestens sechs *Onchocerca-Simulium*-Komplexe, die ihre eigenen klinischen und biologischen Merkmale besitzen.

*Simulium*-Weibchen sind tagaktiv (06.00 bis 18.00 Uhr) und legen ihre Eier auf Wasserpflanzen im schnell fließenden, gut mit Sauerstoff versorgten Gewässern, in deren Nähe meistens auch die Übertragung stattfindet (deswegen auch der Name Flussblindheit). Die Kriebelmücken machen eine Entwicklung über 6-9 Larvenstadien und ein Puppenstadium durch und leben bis zu 4 Wochen.

Die klinische Manifestation der Onchocercose beginnt ein bis drei Jahre nach der Infektion, ein Zeitraum, der sich mit der Präpatenz deckt (Kapitel 2.1). Erst die Mikrofilarien induzieren die charakteristischen pathologischen Veränderungen (ALI et al., 2003; HÖRAUF et al., 2003). Die Larven sind hauptsächlich in der oberen Dermis, in Wurmknötchen sowie Femoral-, Unguinal- und Zervikallymphknoten zu finden, können aber auch in Blut oder Urin sowie in anderen Körperflüssigkeiten auftreten. Die Mikrofilarienbürde kann 2000 Mff pro mg Haut betragen. L1 werden häufig im Auge gefunden, wohin sie hauptsächlich aus der umgebenden Haut einzuwandern scheinen. Charakteristisch für die Onchocercose sind Hautausschläge und Läsionen, die mit starkem Juckreiz einhergehen können, bis hin zu chronischer Dermatitis und Hautatrophie sowie Lymphadenitis und Augenentzündungen, die bis zur vollständigen Blindheit führen können.

Lebende Mikrofilarien scheinen unabhängig von der Lokalisation nicht mit der Entwicklung von schweren Krankheitssymptomen assoziiert zu sein. Wenn die L1 jedoch sterben, kann es auf die degenerierenden Parasiten zu starken entzündlichen Reaktionen kommen, die z.B. im Auge zu den schweren Schäden mit progressiver Sehbehinderung und vollständiger Blindheit führen können (vgl. HÖRAUF et al., 2003). Bis vor kurzem wurden Filarienprodukte für die Entstehung dieser Entzündungsreaktionen verantwortlich gemacht. Neuere Studien sprechen jedoch dafür, dass Rickettsien der Gattung *Wolbachia*, die in den meisten Filarienarten als wahrscheinliche Symbionten auftreten (BANDI et al., 1998, 2001) bei diesen Reaktionen des Wirts eine Rolle spielen. So besteht eine signifikante Korrelation zwischen entzündlichen Reaktionen nach mikrofilarizider Behandlung und erhöhten Konzentrationen von *Wolbachia* DNA im Serum der Patienten (KEISER et al., 2002). Die Granulozyten-Aggregation an Onchocercomen ist offensichtlich abhängig von der Existenz von *Wolbachien*, da Onchocercome bei Patienten nach Behandlung mit Doxycyclin ausgesprochen arm an neutrophilen Granulozyten sind (BRATTIG et al., 2001).

Die Abtötung dieser Bakterien durch die Behandlung der Wirte mit Tetracyclinen resultiert in einer Unterbrechung der Embryogenese bei Filarien-Weibchen (TAYLOR & HOERAUF, 2001; BANDI et al., 2001) und bei der bovinen Onchocercose in einer partiellen adultiziden Wirkung (LANGWORTHY et al., 2000). Diese Effekte sind strikt mit dem Verlust der

*Wolbachia*-Symbionten assoziiert und werden bei Filarienspezies, die keine Bakterien enthalten, nicht beobachtet. Zu letzteren gehören die menschlichen Filarien *L. loa* und *M. perstans* (GROBUSCH et al., 2003; MCGARRY et al., 2003; BÜTTNER et al., 2003), die Nagerfilarie *A. viteae*, die Hirschfilarie *O. flexuosa* und die Pferdefilarie *Setaria equina* (MCLAREN et al., 1975; PLENGE-BÖNIG et al., 1995; BANDI et al., 1998; CHIRGWIN et al., 2002). Eine aktuelle Studie zeigt, dass *Wolbachia*-Bakterien aus *L. sigmodontis* auf *A. viteae* übertragen werden können (HARTMANN et al., 2003).

Neuere Studien zeigten, dass Endotoxin-ähnliche *Wolbachia*-Produkte einen wesentlichen proinflammatorischen Reiz im Auge darstellen (HALL & PEARLMAN, 2002). Weitere molekulare Analysen belegten die Beteiligung von Lipopolysaccharid-ähnlichen Molekülen in diesem Prozess, und zwar durch die Bindung an ihren Rezeptor TLR4 („Toll-like“ Rezeptor) auf Säugetierzellen (ST. ANDRE, 2002).

Bei der Onchocercose, wie auch bei der lymphatischen Filariose reicht die Manifestation von der asymptomatischen Infektion bis zu den beschriebenen starken pathologischen Veränderungen (MURDOCH, 1992; KING & NUTMAN, 1992), wobei das Spektrum der klinischen Symptome mit unterschiedlicher Ausprägung der zellulären Immunantwort korreliert. In für Onchocercose endemischen Gebieten bleiben einige Bewohner offensichtlich frei von der Infektion, obwohl sie ständig einem Infektionsrisiko mit *O. volvulus* ausgesetzt sind. Diese Personen weisen immunologisch eine dominante Typ1-T-Helferzellen ( $T_H1$ )-Antwort auf Filarienantigene (WARD et al., 1988; ELSON et al., 1995) auf. Eine zweite Kategorie von Individuen ist anfangs klinisch asymptomatisch, obwohl Mikrofilarien in der Haut nachgewiesen werden. Diese Personen sind immunologisch durch eine Antigen-spezifische zelluläre Anergie oder Hyporesponsivität (GREENE et al., 1983) sowie vor allem durch eine verringerte Induzierbarkeit  $T_H1$ -typischer Zytokine (IFN- $\gamma$  und IL-2) charakterisiert (GREENE et al., 1985a; GALLIN et al., 1988). Dem steht die dritte Kategorie von Patienten gegenüber, bei denen man keine oder nur sehr wenige Mikrofilarien nachweisen kann, die aber heftige zelluläre Reaktionen auf parasitenspezifische Antigene (GREENE et al., 1983) zeigen und starke Hautveränderungen entwickeln. Mikrofilarien-positive Personen mit entzündlicher Augenkrankheit zeigen im Unterschied zu solchen Personen ohne gleichzeitige Augensymptomatik eine deutlich ausgeprägte  $T_H2$ -Typ-Zellantwort (PLIER et al., 1996). Viele Faktoren werden für diese voneinander abweichenden Reaktionsformen verantwortlich gemacht: pränatale (intrauterine *O. volvulus*-Exposition) oder frühe postnatale (über *O. volvulus*-Antigene in der Muttermilch infizierter Frauen) Toleranzinduktion (PETRALANDA, 1988; ELSON et al., 1996), genetische Prädisposition des humanen Wirtes

(MEYER et al., 1994), Immunmodulation durch extrazelluläre und zirkulierende Parasitenantigene (ALLEN & MACDONALD, 1998; HASLAM et al., 1999; WHELAN et al., 2000; SCHONEMEYER et al., 2001; SOMMER et al., 2003) und unterschiedliche Polarisierung der T-Helferzellen-Immunantwort (MAIZELS et al., 1993; PLIER et al., 1996; DOETZE et al., 2000).

### **2.3 Die Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae* und ihre Verwendung in der experimentellen Filarienforschung**

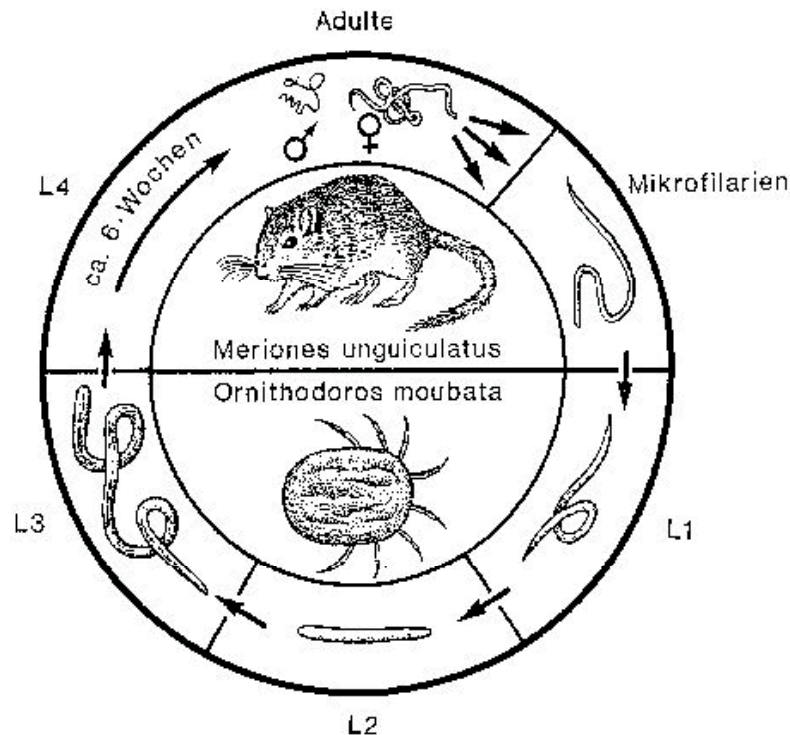
Untersuchungen über die Mechanismen von Immunität, Toleranz und Pathologie menschlicher Filarieninfektionen sind auf Grund der strengen Wirtsspezifität der Parasiten nur eingeschränkt möglich, so dass auf Tiermodelle ausgewichen werden muss. Eine gut untersuchte Art in verschiedenen Modellsystemen ist die Bindegewebsfilarie *Acanthocheilonema viteae* (HAQUE et al., 1980, 1981, 1988; HARNETT et al., 1989; ADAM et al., 1994; LUCIUS & TEXTOR, 1995; MISRA et al., 1998; ABRAHAM et al., 2002), die als Zwischenwirt Lederzecken der Gattung *Ornithodoros* und als Endwirte ein bestimmtes Spektrum an Nagern aufweist. Als natürliche Endwirte wurden die Libysche Rennmaus (*Meriones libycus*), die Persische Rennmaus (*Meriones persicus*) und die Grosse Rennmaus (*Rhombomys opimus*) identifiziert (WEISS, 1970). Als infektionsresistente Tiere sind Laborratten, weisse Mäuse und Meerschweinchen bekannt (WORMS et al., 1961). Bisher wurden als experimentelle Endwirte hauptsächlich Mongolische Rennmäuse (*Meriones unguiculatus*), Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) und Vielzitzenmäuse [*Mastomys coucha* (SMITH, 1836), oft als *Mastomys natalensis* (SMITH, 1834) bezeichnet (KRUPPA et al., 1990)] eingesetzt. Der Infektionsverlauf variiert zwischen diesen Wirtsspezies (WEISS, 1978; SÄNGER & LÄMMLER, 1979; LUCIUS et al., 1987), was u.a. vergleichende Studien von spezifischen Aspekten der Wirt-Parasit-Beziehung erlaubt. Der Lebenszyklus ist in Abb. 2-2 am Beispiel der Mongolischen Rennmaus (*M. unguiculatus*) dargestellt. In diesem Zyklus dient die Lederzecke *Ornithodoros moubata* als Zwischenwirt, die bei der Blutmahlzeit Mikrofilarien aufnimmt. Diese entwickeln sich dann innerhalb von etwa 30 Tagen durch zweimaliges Häuten zu infektiösen Drittlarven (L3; 1.3-1.6 mm). Infizierte *O. moubata* können allerdings im Unterschied zu *O. tartakowski* (LONDONO, 1976b) offensichtlich durch Blutsaugen keine L3 auf *M. unguiculatus* übertragen (LUCIUS & TEXTOR, 1995). Das Übertreten der Drittlarven bei einer natürlichen Infektion erfolgt immer zu Beginn einer Blutmahlzeit innerhalb von 30 bis 60 Sekunden, wobei das Signal für die

Abgabe immer der Stich der Zecke ist und nicht die Blutaufnahme (BAIN, 1967; LONDONO; 1976a). Die Häutung zur Larve 4 erfolgt bei *M. unguiculatus* um den 7. Tag p.i. und zu Präadulten am 23. Tag p.i. (JOHNSON et al., 1974). Die adulten Männchen (Länge 20-42 mm, Ø 0.16 mm) und Weibchen (Länge 40-72 mm, Ø 0.3 mm) halten sich im subkutanen Bindegewebe auf, wo es zur Begattung der Weibchen kommt. Die Präpatenz beträgt bei der Mongolischen Rennmaus 47 Tage (JOHNSON et al., 1974) und bei der Vielzitzenmaus 49 (CHANDRASHEKAR et al., 1990) bis 57 (SÄNGER & LÄMMLER, 1979) Tage. Die *A. viteae*-Weibchen entlassen unbescheidete Mikrofilarien, die im Blut zirkulieren. Der Verlauf der Mikrofilariämie bei *M. coucha* ist durch einen langsamen Anstieg der Mikrofilarien im zirkulierenden Blut auf ein relativ niedriges Maximum von im Durchschnitt < 10 Mff/µl Blut um 192 Tage p.i. gekennzeichnet (SÄNGER & LÄMMLER, 1979). Anschliessend folgt ein schneller Abfall der Mikrofilariendichte, wobei jedoch bis 261 Tage p.i. Mikrofilarien im Blut nachweisbar waren. Bei *M. unguiculatus* sind Mikrofilarienkonzentrationen bis 1000 Mff/µl Blut nicht selten, wobei ein Anstieg bis 210 Tage p.i. stattfindet, und die Mikrofilarien bis zum 18. Monat nachweisbar sind (BEAVER et al., 1974; LUCIUS & TEXTOR, 1995). Diese Zahlen geben aber nur einen Teil der im Wirtsorganismus tatsächlich vorhandenen Larven wieder. Ihre Verteilung in den Organen bei *M. lybicus* wurde von WORMS et al. (1961) durch histologische Untersuchung von Organ- und Gewebsgefrierschnitten dargestellt: z.B. enthielten Blut 53.3%, Skelettmuskulatur 37.1%, Herzmuskulatur 2.6% oder Niere und Lunge 2.3% der gesamten Mikrofilarien. Diese Zahlen können jedoch nicht auf das lebende Tier übertragen werden, da postmortal eine Wanderung der Mikrofilarien stattfindet, da die Anzahl der Blutmikrofilarien beim lebenden geringer als beim toten Tier ist. Umgekehrt muss die Lunge intra vitam eine Speicherfunktion besitzen, denn nach dem Tod ist ein Anstieg von 0.3 Mff/µl auf 143 Mff/µl Blut im linken Ventrikel zu finden, was für eine erhebliche Freisetzung aus der Lunge in den linken Ventrikel und die vorgeschalteten Gefäße spricht (WORMS et al., 1961). Bei *M. coucha* scheint die Speicherfunktion der Lunge besonders ausgeprägt zu sein (vgl. SÄNGER & LÄMMLER, 1979), d.h. die relativ niedrigen Mikrofilariämiewerte bei diesem Wirt spiegeln bei Weitem nicht die tatsächliche Larvenmenge im Organismus wider.

Bei experimenteller Infektion mit 50 L3 konnten in *M. coucha* am 300. Tag p.i. keine lebenden Weibchen mehr gefunden werden (SÄNGER & LÄMMLER, 1979); CHANDRASHEKAR et al. (1990) geben als Überlebenszeitraum 390 Tage an. In *M. unguiculatus* konnten bis 750 Tage p.i. lebende Würmer isoliert werden, die noch Mikrofilarien bzw. Spermien enthielten (JOHNSON et al., 1974). Die Überlebensfähigkeit



adulten Parasiten ist auch beim natürlichen Endwirt begrenzt. Die Kalzifikation oder Lysis von Parasiten setzt bei *M. lybicus* etwa mit dem 15. Infektionsmonat ein; lebende adulte Würmer konnten noch bis 19 Monate p.i. gefunden werden (WEISS, 1970).



**Abbildung 2-2: Entwicklungszyklus der Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae***  
(Archiv des Lehrstuhls für Molekulare Parasitologie, HU Berlin)

Nach paarweiser Transplantation von 1, 2, oder 3 adulten männlichen und weiblichen *A. viteae* in nicht infizierte Wirte (*M. unguiculatus*) persistierten die Parasiten bis zu 2 Jahre (BEAVER et al., 1974). *A. viteae*-Mikrofilarien können während der Patenz transplazentar (vertikal) von der Mutter auf die Nachkommen übertragen werden (HAQUE & CAPRON, 1982; HAQUE et al., 1988). Eine intrauterine Infektion mit *A. viteae*-Mikrofilarien führte bei Ratten zu einer reversiblen Immuntoleranz, die in einem ansonsten resistenten Rattenstamm die Entwicklung von geschlechtsreifen *A. viteae* nach Infektion mit L3 ermöglichte (HAQUE & CAPRON, 1982).

Die Rückfindungsrate adulter Würmer in *M. coucha* betrug 140 bzw. 189 Tage p.i. 47.6% und 26.4% der inokulierten 50 L3 (SÄNGER & LÄMMLER, 1979). In *M. unguiculatus* war die Rückfindungsrate adulter *A. viteae* 84 Tage p.i. 20-30%, unanhängig von der Anzahl der inokulierten Larven (LUCIUS & TEXTOR, 1995).

Das Verschwinden der Mikrofilarien aus dem Blut von *M. coucha* korreliert mit dem Erscheinen von zytotoxischen Antikörpern, die erstmals ab Tag 105 bis 126 p.i. nachweisbar sind (CHANDRASHEKAR et al., 1990). Über Serum infizierter *M. coucha* (252 Tage p.i.) liessen sich *in vitro* bei Anwesenheit von Wirtslymphozyten 70% der Mikrofilarien abtöten. Für die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen L1 *in vitro* und *in vivo* sind IgM-Antikörper verantwortlich. Durch Transfer dieser IgM-Fraktion lässt sich die ADCC vermittelte Immunität gegen Mikrofilarien auch auf infizierte Tiere in der Patenz übertragen. Makrophagen waren effektiver zytotoxisch als eosinophile und neutrophile Granulozyten. In Sera amikrofilarämisch gewordener *M. unguiculatus* konnten Antikörper gegen die Mikrofilarienoberfläche gefunden werden, die eine Zelladhärenz und Eliminierung der L1 bewirkten (LUCIUS & TEXTOR, 1995). Die ADCC von Makrophagen gegen *A. viteae*-Mikrofilarien bei Ratten *in vitro* ist stadienspezifisch und abhängig von IgE (HAQUE et al., 1980). Die ADCC gegen L1 bei Ratten, vermittelt durch neutrophile Granulozyten *in vitro*, ist spezifisch für Mikrofilarien von *A. viteae* und abhängig von IgE, IgG und Komplement (AIME et al., 1984).

*A. viteae* verursacht nicht die typischen Haut- und Augenveränderungen wie *O. volvulus*, sondern wird von den Endwirten gut toleriert. Trotzdem können Ergebnisse aus diesem Modellsystem wichtige Hinweise für die humane Parasitose liefern, da sich die Adultwürmer wie bei der Onchocercose im subkutanen Bindegewebe aufhalten und hohe Homologien von Antigenen zwischen *O. volvulus* und *A. viteae* bestehen (u.a. WILLENBÜCHER et al., 1993; ADAM et al., 1996). Das *A. viteae*-Modellsystem eignet sich auch zum Screening von Substanzen auf filarizide Wirkung (ZAHNER & SCHARES, 1993) und wurde zur exemplarischen Charakterisierung von Antigenen als potentielle Vakzine-Kandidaten verwendet, da die Nager durch eine Immunisierung mit Strahlen-attenuierten infektiösen L3 und exkretorischen Antigenen gegen Belastungsinfektionen partiell geschützt werden können (TANNER & WEISS, 1981; LUCIUS et al., 1986; 1991; ABRAHAM et al., 1986; 2002; BLEISS et al., 2002).

## **2.4 Entstehung, Struktur und Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide**

### **2.4.1 Die Dichotomie bezüglich der Mikrofilarienscheide**

Die Eier von Nematoden sind generell von einer komplex aufgebauten Eihülle umgeben, die nach einem gemeinsamen Grundmuster gebildet wird, aber im Einzelnen so verschieden sein

kann, dass unter den zahlreichen Eitypen von Nematoden die Zahl der Eihüllenschichten von 1-5 variiert (WHARTON, 1980). Im grundsätzlichen Aufbau besteht die Eihülle von innen nach außen aus einer Lipidschicht, einer medianen Schicht, die Chitin-Mikrofibrillen eingebettet in eine prolinreiche Matrix enthält und einer äußeren, aus der Vitellinmembran, die sich mit der Fertilisierung der Oozyte bildet, hervorgehenden Lage. Zusätzlich kann es zur Auflagerung von maternalem Material auf die Eioberfläche kommen. Bei Filarien trennt sich nach der dritten bis vierten Teilung der Zygote die Eihülle vom Embryo. Während der intrauterinen Embryonalentwicklung entsteht im Uterus aus der Eihülle durch Umstrukturierung unter Beteiligung von sekretierten Produkten des Embryos und des maternalen Uterusepithels und durch Modellierung der sich streckenden Mikrofilarie die Mikrofilarienscheide (Abb. 2-3, 2-4, 2-5; ROGERS et al., 1976; SCHRAEMEYER et al., 1987). Diese umgibt die Mikrofilarie im Blut als lose, extrakutikuläre und allumschliessende Hülle. Bei Filariengattungen, welche unbescheidete Mikrofilarien freisetzen (z.B. *A. viteae* und *O. volvulus*), kommt es intrauterin zum Schlupf aus der Eihülle (Abb. 2-3, 2-4).



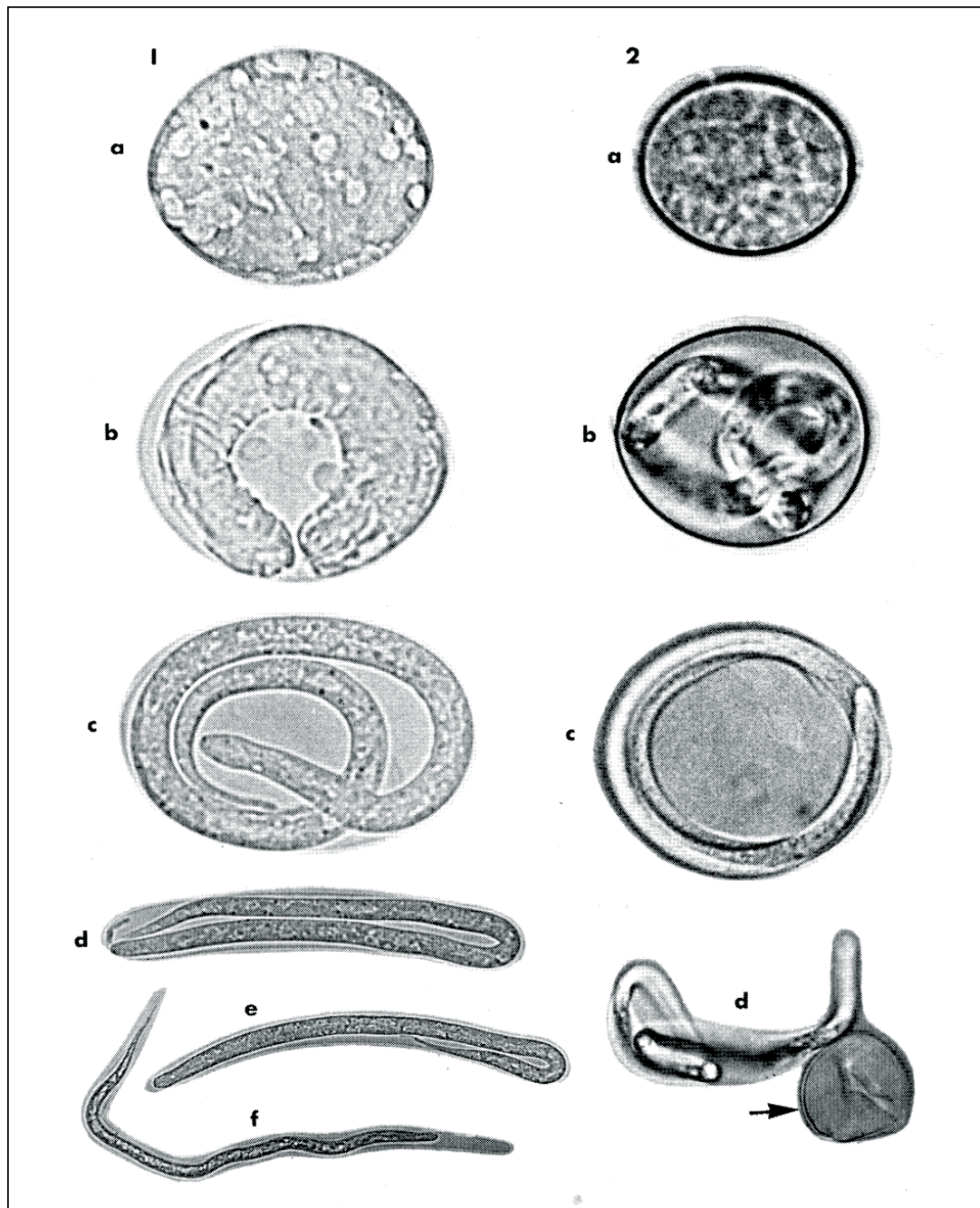
**Abbildung 2-3: Unbescheidete Mikrofilarie von *Mansonella perstans* (links) und bescheidete Mikrofilarie von *Loa loa* (rechts), die gleichzeitig im Blut eines Menschen zirkulierten (Dicker Tropfen; CDS, Image Library).**

In dem paarig angelegten Uterus von Filarien können fünf aufeinanderfolgende Abschnitte mit morphologisch unterscheidbaren Entwicklungsstadien von Mikrofilarien abgegrenzt werden (ROGERS et al., 1976; FRANZ & ANDREWS, 1986; BÜTTNER et al., 1988). Nach der Befruchtung entwickeln sich über Morulastadien die undifferenzierten, multizellulären Embryonen. Diese invaginieren und bilden eine C-Form, und später ein Wurmstadium, das

Brezel- bzw. Ring-ähnlich aufgeknäuelte ist. Mit dem Erreichen dieses Stadiums ist das Längenwachstum der heranreifenden Embryonen abgeschlossen (Abb. 2-4). Danach streckt sich bei Arten mit bescheideten L1 die Mikrofilarie und dehnt die sie umgebende Eihülle, wobei die Mikrofilarie zuerst eine Hufeisenform einnimmt und schliesslich vollends gestreckt ist. Bei Arten mit unbescheideten Mikrofilarien kommt es nicht zu einer Dehnung der Eihülle. Die Mikrofilarie durchbricht vielmehr mit ihrem Vorderende die Eihülle und windet sich heraus, wobei die leere, kollabierte Eihülle am Hinterende der vollentwickelten, unbescheideten Mikrofilarien oft noch vorübergehend beobachtet werden kann (Abb. 2-4).

Der Übergang vom Brezel-Stadium zu gestreckten Mikrofilarien geht bei Arten mit bescheideten L1 mit erheblichen strukturellen Veränderungen der zur Scheide werdenden Eihülle einher. Dabei wird auch das in der Eihülle vorhandene Chitin abgebaut (SCHRAEMEYER et al., 1987a; PETERS et al., 1987). Entsprechend konnte in der biochemischen Analyse von Mikrofilarienscheiden aus Blutmikrofilarien kein N-Acetyl-Glucosamin, der Baustein von Chitin, nachgewiesen werden (KLONISCH et al., 1991; BARDEHLE et al., 1992a). Nachdem in immunhistologischen Studien mit Antikörpern gegen eine rekombinante Chitinase aus L3 von *W. bancrofti* eine homologe Chitinase in intrauterinen Mikrofilarien von *B. malayi* nachgewiesen wurde (RAGHAVAN et al., 1994), könnte der Abbau über diese erfolgen. Intrauterine Mikrofilarien von Filarien-Gattungen, die unbescheidete Mikrofilarien freisetzen, exprimieren ebenfalls eine Chitinase. Diese Chitinase konnte bei *A. viteae* in der Epidermis und in der Kutikula von intrauterinen L1 in dem Stadium, wo die Mikrofilarien noch von der sphärischen Eihülle umschlossen sind, lokalisiert werden (ADAM et al., 1996). Es erscheint denkbar, dass damit der Austritt der Mikrofilarien aus den chitinhaltigen Eihüllen ermöglicht wird.

Mit dem Strecken der Larven und der Ausdehnung der primären Eihülle wird diese bei *L. sigmodontis* von 20 nm auf 2-3 nm und bei *B. malayi* von ca. 35 nm auf 7 nm verdünnt und stellt danach die sog. homogene Schicht der Scheide dar. Diese wird durch den Uterus mit einer sog. granulären oder uterinen Schicht verstärkt. Im Abschnitt des Brezel-Stadiums und distal davon weist das Uterusepithel eine hohe Translationsaktivität und zahlreiche Vesikel auf, deren Inhalt in das Uteruslumen sekretiert und im Stadium der gestreckten Mikrofilarien partikulär auf die aus der Eihülle hervorgehende, primäre Scheide aufgelagert wird.



**Abbildung 2-4: Vergleichende Darstellung der intrauterinen Entwicklungsstadien der Mikrofilarien von *Brugia pahangi* (1) und *Onchocerca gutturosa* (2) (modifiziert nach ROGERS et al., 1976).**

**1** (vertikale Bildreihe links) - Entwicklungsstadien der bescheideten Mikrofilarien von *B. pahangi*: (a) befruchtete Oozyte in der Eihülle im proximalen Teil des Uterus; (b) C-förmiger Embryo; (c) Ring- und Brezelstadien in der Eihülle; (d) typische Hufeisenform der sich streckenden Mikrofilarie; (e) Übergangsstadien zur gestreckten, reifen, bescheideten L1 im distalen Teil des Uterus (f). **2** (vertikale Bildreihe rechts) - Entwicklungsstadien der unbescheideten Mikrofilarien von *O. gutturosa*: (a), (b) und (c) sind den entsprechenden Stadien von *B. pahangi* ähnlich, danach schlüpft aber aus der Eihülle (Pfeil) die reife, unbescheidete Mikrofilarie (d). Mit einem Pfeil ist leere, kollabierte Eihülle am Hinterende der vollentwickelten, unbescheideten L1 dargestellt.

Die partikuläre Auflagerung besteht aus elektronendichten, globulären Produkten mit einer irregulären Grösse bis 120 nm bei *B. malayi* (SCHRAEMEYER et al., 1987b, ARAUJO et al., 1994), bis 7 nm bei *L. sigmodontis* (SCHRAEMEYER et al., 1987b) und bis 150 nm bei *W. bancrofti* (DE SOUZA et al., 1989; ARAUJO et al., 1994). Diese Partikel lassen sich nicht durch SDS-Extraktion ablösen (BARDEHLE et al., 1992b).

#### 2.4.2 Biochemische Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide

Nachdem eine Methode zur Isolierung hochreiner Mikrofilarienscheiden entwickelt worden war (BARDEHLE et al., 1987), konnte die biochemische Zusammensetzung der Scheiden von *L. sigmodontis* (BARDEHLE et al., 1992a) und *Brugia spp.* (KLONISCH et al., 1991) analysiert werden. Bei *L. sigmodontis* wurden bisher ca. 73% des Scheiden-Trockengewichtes analytisch erfasst: 54% stellen Aminosäuren, 8% Kohlenhydrate (3.3% Galaktosamin, 4.3% Uronsäuren) und 11% anorganische Komponenten (9.3% Phosphat, 1.5% Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>) dar. Zwei weitere, quantitativ bedeutende Komponenten sind Galaktose und Dimethylaminoethanol (DMAE; macht 3.3 Mol% des Scheidenhydrolysats aus), sowie in geringen Mengen (0.3 Mol%) Cholin (HINTZ et al., 1996; KASPER, 2000). Bei *B. malayi* wurde eine Aminosäure- und Kohlenhydratanalyse, bei *B. pahangi* nur eine Aminosäureanalyse durchgeführt; eine Trockengewichtsbestimmung war wegen des Materialmangels nicht möglich. Die Kohlenhydratanalyse ergab 1.4 Mol% N-Acetyl-Galaktosamin, 3.5 Mol% Glukose und 0.1 Mol% Galaktose (Uronsäuren wurden nicht analysiert; Glukose könnte nach Ansicht von KLONISCH et al., 1991, auch auf eine Kontamination zurückzuführen sein). Scheiden von *Brugia spp.* enthalten ebenfalls DMAE, aber in deutlich geringeren Mengen als bei *L. sigmodontis* (HINTZ, 1995). Die Aminosäurezusammensetzung der Scheiden beider Gattungen ist durch einen hohen Gehalt an Prolin und Glutamin geprägt.

#### 2.4.3 Die Proteine der Mikrofilarienscheide

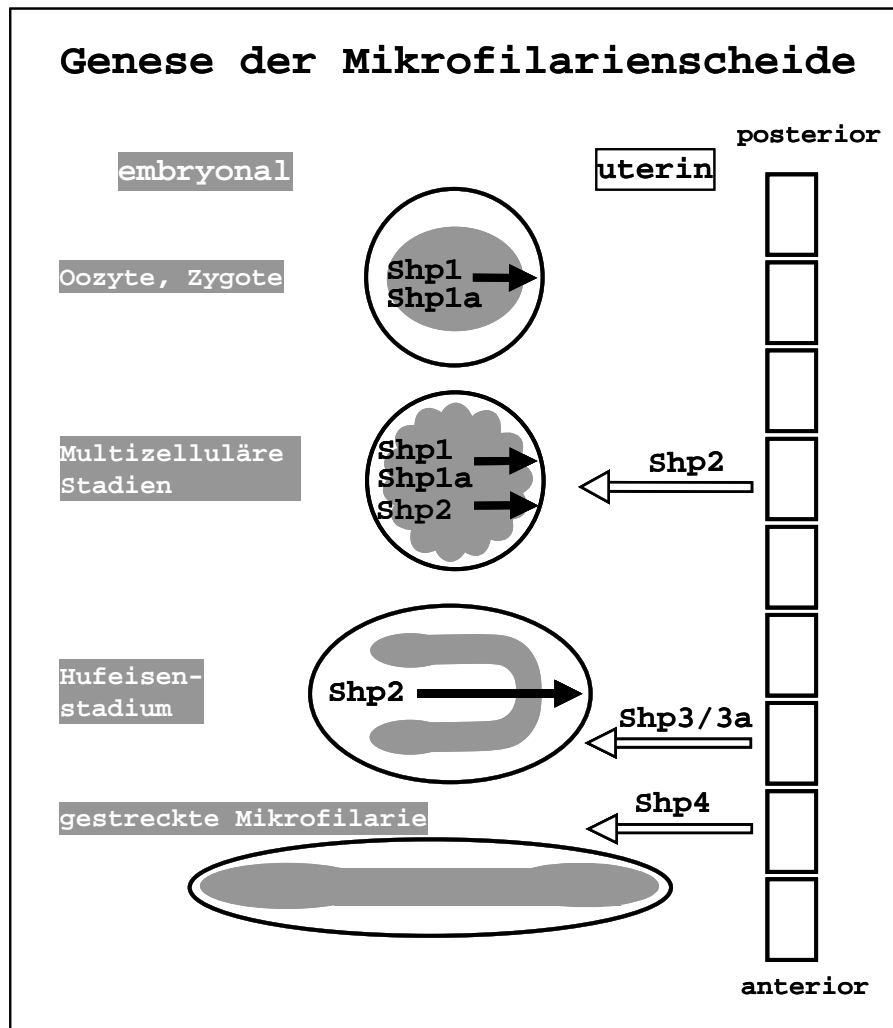
##### 2.4.3.1 Die Hauptproteine der Mikrofilarienscheide

In den vergangenen Jahren wurden sechs Hauptproteine der Mikrofilarienscheide von *L. sigmodontis*, Shp1, Shp1a, Shp2, Shp3, Shp3a und Shp4 sowie ihre Orthologe bei *Brugia spp.* auf molekularer Ebene charakterisiert. Die Proteine Shp1 und Shp2 sind Bestandteil der aus



der primären Eihülle entstandenen Scheidenmatrix (Basisschicht). Das Protein Shp1 (früher als gp22 bzw. Mf22 bezeichnet; BARDEHLE et al., 1991; SELKIRK et al., 1991; CHRIST et al., 1992) wurde als Hauptbestandteil des SDS/ME-löslichen Scheidenextraktes bei *L. sigmodontis* identifiziert. Die Gene *shp1* und *shp1a* von *L. sigmodontis* liegen in konvergenter Orientierung eng gekoppelt im Genom, und die Aminosäuresequenzen von Shp1 und Shp1a sind zu 43% identisch (HIRZMANN, 1997). Die Transkription von *shp1* konnte bereits in Oozyten in der Rachiszone beobachtet werden, steigt zu einem Maximum in multizellulären Embryonen an und lässt während der Reifung der Mikrofilarien nach (Abb. 2-5). Bei gestreckten Stadien lassen sich deutlich weniger Transkripte von *shp1* nachweisen, bei reifen, intrauterinen Mikrofilarien wird das Gen kaum noch transkribiert, in Blutmikrofilarien fehlt das Transkript vollständig (CONRATHS et al., 1993). Während die Transkription von *shp1* bereits in unbefruchteten Oozyten nachgewiesen wurde, fand sich das Protein frühestens bei multizellulären Embryonen, bei denen es in den Embryonen, im Zwischenraum von Embryo und Eihülle und in den Eihüllen lokalisiert wurde. Bei reifen Mikrofilarien findet sich das Protein in der inneren, homogenen Schicht der Mikrofilarienscheide (BARDEHLE et al., 1991; CONRATHS et al., 1993; ZAHNER et al., 1995). Ein Shp1-Ortholog wurde mit gleicher Lokalisation auch bei *B. malayi* identifiziert (SELKIRK et al., 1991). Ähnliche Verhältnisse wie für Shp1 scheinen für das paraloge Protein Shp1a vorzuliegen (HIRZMANN, Giessen, pers. Mitteilung; Abb. 2-5).

Shp2 stellt das Haupt-Matrixprotein der Mikrofilarienscheide dar. Dieses Protein bildet ca. 50% der Scheidenproteinmasse, wobei es unter reduzierenden Bedingungen mit SDS/ME unlöslich ist (HINTZ et al., 1994; HINTZ, 1995). Shp2 ist in intakten Mikrofilarienscheiden für Antikörper nicht zugänglich und eine immunhistologische Darstellung ist erst nach enzymatischer Vorbehandlung mit Chymotrypsin A möglich (CONRATHS et al., 1997). Dieses Ergebnis zeigt, dass Shp2 Bestandteil der inneren, homogenen Schicht der Mikrofilarienscheide ist. Durch Northern-Blot-Analyse und *in situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass Shp2 von *L. sigmodontis* geschlechts- und stadienspezifisch im Uterusepithel und in intrauterinen multizellulären Embryonen adulter Weibchen transkribiert wird (HIRZMANN, 1997; Abb. 2-5) und bei *B. malayi* zumindest auch dort translatiert wird (CONRATHS et al., 1997). Shp2 findet sich in der Mikrofilarienscheide ausschliesslich als Polymer, während es in adulten, weiblichen *L. sigmodontis* als Monomer synthetisiert wird.



**Abbildung 2-5: Genese der Mikrofilarienscheide von *Litomosoides sigmodontis***

Die Ring- und Brezelstadien, die sich nach den multizellulären Embryonen und vor der Streckung der Mikrofilarien (Hufeisenstadium) ausbilden, sind auf der schematischen Abbildung links nicht dargestellt (Herkunft der Daten vgl. Text).

Die Vernetzung erfolgt über kovalente Bindungen [ $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Bindungen] und Disulfidbrücken (TARCSA et al., 1992). In Blutmikrofilarien waren weder Shp2-Transkripte (HIRZMANN et al., 1995), noch Shp2-Monomere nachweisbar (CONRATHS et al., 1997).

Die *L. sigmodontis*-Scheidenproteine Shp3 und Shp3a sind neben Shp1 die Hauptkomponenten der SDS/ME-löslichen Scheidenproteine (BARDEHLE et al., 1992; HINTZ et al., 1994). Shp3 und Shp3a wurden im Immunoblot (120 kDa bzw. 40 kDa) als Oberflächenproteine durch Antikörper identifiziert, die spezifisch mit der Mikrofilarienscheiden-Oberfläche reagieren (SCHARES et al., 1994). Beide Proteine besitzen damit oberflächenlokalisierte Epitope. Die Expression (SCHARES et al., 1994) und die Transkription (HIRZMANN et al., 2002) der Proteine Shp3 und Shp3a findet im Uterus-Epithel des apikalen, die ersten 2 cm umfassenden Wurmabschnittes statt, der ausgestreckte



Mikrofilarien enthält. Nach der Sekretion werden beide Proteine auf die Scheidenoberfläche aufgelagert (Abb. 2-5). Sera, die 15-36 Tage p.i., d.h. in der Präpatenz von *L. sigmodontis*-infizierten *M. coucha* isoliert worden waren, erkannten in Immunoblots in SDS/ME-Extrakten der Scheiden selektiv die 40 kDa und 120 kDa-Banden, wogegen nach dem Tag 36, aus der Patenz oder der Postpatenz gewonnene Sera keine Reaktion zeigten (BARDEHLE, 1990).

Die *shp3*- und *shp3a*-Gene und cDNAs von *L. sigmodontis* und deren Orthologe von *B. malayi* und *B. pahangi* wurden kloniert und sequenziert (HIRZMANN, 1997; HIRZMANN et al., 2002). Sie kodieren für sekretorische, Muzin-ähnliche Proteine, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen in drei Domänen unterteilt werden können: in eine N-terminale Signalsequenz, eine zentrale Serin/Threonin-reiche Sequenz mit überwiegend repetitiver Anordnung und eine an hydrophoben Aminosäuren reiche C-terminale Sequenz mit dem konservierten Tryptophan-Motiv WWCWW. Die genomische Analyse ergab, dass die paralogen Gene *shp3a* und *shp3* bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* in einem Tandem, mit einem Abstand von 5,5 kb (vgl. Abb. 8-2) organisiert sind, und eine hoch konservierte Promotorregion (Homologie 75% über einen Bereich von 247 bp) besitzen.

Die errechneten Molekulargewichte für die reifen *Ls-Shp3* und *Ls-Shp3a* liegen mit 24.6 kDa und 10.8 kDa deutlich unter den durch SDS-PAGE abgeschätzten Massen von 120 kDa und 40 kDa, und der für *Ls-Shp3a* durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie exakt bestimmten molaren Masse von 45.5 kDa (HINTZ, 1995). Für die Differenz zwischen Aminosäure-Masse und tatsächlicher Molekülmasse, die im Fall von *Ls-Shp3a* 75% der molaren Masse ausmacht, sind Modifikation des Proteins mit Dimethylaminoethanol (DMAE 50 Mol%; HINTZ et al., 1996) verantwortlich. Da in keinem der aus dem konservierten C-Terminus stammenden tryptischen und chymotryptischen Fragmente DMAE nachgewiesen werden konnte (HINTZ, 1995), sind die Modifikationen an die Serin- und/oder Threonin-Seitenketten der Serin/Threonin-reichen Region gebunden, die 82% (*Ls-Shp3*) bzw. 56% (*Ls-Shp3a*) der Aminosäuresequenz der reifen Proteine ausmachen. DMAE ist durch Phosphodiesterbindung an Kohlenhydratmoleküle - u.a. das Trisaccharid GalNAc - gebunden, die wiederum O-glykosidisch mit der Polypeptidkette von Shp3 und Shp3a von *L. sigmodontis* verknüpft sind (KASPER, 2000). IIFT-Analysen der intrauterinen Embryonalstadien von *L. sigmodontis* mit einem Antikörper gegen die DMAE-Modifikationen zeigten, dass nur Scheidenoberflächen gestreckter Mikrofilarien reagieren, was im Einklang mit Expression von Shp3 und Shp3a im Epithel des distalen, gestreckte Mikrofilarien enthaltenden Uterusabschnittes steht (vgl. HIRZMANN et al., 2002).

Bei *B. malayi* konnte DMAE als Modifikation ebenfalls nachgewiesen werden, der molare Anteil an den Gesamtscheiden war jedoch wesentlich geringer als bei *L. sigmodontis* (HINTZ, 1995). Als Ursache hierfür werden entweder eine geringere Modifikation von Shp3 und Shp3a mit DMAE oder ein geringerer molarer Anteil dieser Scheiden-Oberflächenproteine bei *B. malayi* diskutiert (HIRZMANN, 1997).

Frühere Studien haben gezeigt, dass beide Mikrofilarienscheiden-Oberflächenproteine (*Ls-Shp3* und *Ls-Shp3a*) und ein ES-Protein von juvenilen *L. sigmodontis*-Weibchen (Juv-p120) kreuzreagieren (SCHARES et al., 1994). Die molekulare Charakterisierung von Juv-p120 ergab, dass es ebenso wie Shp3 und Shp3a posttranslational hochgradig mit DMAE modifiziert ist, und dass die Kreuzreaktivität auf den gemeinsamen Modifikationen mit DMAE beruht (WAGNER, 1998; HINTZ et al., 1998). Die DMAE-Moleküle sind bei diesem ES-Protein ebenfalls über Phosphodiesterbrücken mit O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden in der Serin/Threonin-reichen Region verknüpft (KASPER, 2000). Präadulte *L. sigmodontis*-Weibchen sezernieren Juv-p120 an Tag 32 und 46 p.i., von adulten Weibchen wurde es nicht sezerniert (SCHARES et al., 1994). Dieses Ergebnis deckt sich mit älteren Untersuchungen, die bei 40 bis 42 Tage alten *L. sigmodontis*-Weibchen ein 130-160 kDa grosses ES-Produkt beschreiben (HARNETT et al., 1986). Juv-p120 wird *in vivo* sowohl in der Pleurahöhle infizierter *M. coucha* (Tag 38 p.i., HINTZ et al., 1998), als auch im Blut infizierter Tiere gefunden (Tag 41 und 45 p.i., TAUBERT, pers. Mitteilung).

Shp4 ist das letzte von fünf löslichen Scheidenproteinen (nach Shp1, 1a, 3, 3a), das durch die Desintegration und Radiocarboxymethylierung der Mikrofilarienscheide von *L. sigmodontis* erfasst werden konnte (HINTZ, 1995). Legt man Coomassie- und Silberfärbung der SDS-PAGE zugrunde, so ist Shp4 im Vergleich zu den anderen löslichen Scheidenproteinen mengenmässig in der Scheide in geringerer Konzentration vorhanden. Das vollständige *shp4*-Gen wurde isoliert und charakterisiert (HIRZMANN, 1997). Die Southern-Blot-Analyse ergab, dass *shp4* in nur einer Kopie im Genom vorliegt. Das abgeleitete *Ls-Shp4*-Protein besitzt ein Signalpeptid und ein 6-Cystein-Motiv. Anders als die bisher beschriebenen Scheidenproteine hat *Ls-Shp4* keine repetitiven oder durch die AS-Zusammensetzung auffälligen Motive. Die Northern-Blot-Analyse zeigte wie bei den anderen aus der Scheide isolierten Proteinen eine weibchenspezifische Transkription, wobei *Ls-shp4* nur in den terminalen Wurmsegmenten mit reifen Embryonalstadien transkribiert wird (Abb. 2-5). Eine Isolierung der homologen Gene von *Brugia* spp. war aufgrund der fehlenden Kreuzhybridisierung nicht möglich, eine homologe *Bm*-EST-Sequenz wurde aber kürzlich in der Datenbank identifiziert (HIRZMANN et al., in Vorbereitung).

#### 2.4.3.2 Weitere Proteine der Mikrofilarienscheide

Mittels eines polyklonalen Antiserums gegen *L. sigmodontis*-Mikrofilarienscheiden wurde aus einer cDNA-Expressionsbank adulter weiblicher *B. pahangi* ein weiterer Klon identifiziert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine auffällige Homologie (40% Identität) zu einem *Drosophila*-Protein unbekannter Funktion besitzt. Das Protein wird inzwischen als neues Scheidenprotein Shp6 geführt (REITZENSTEIN, 2003). Ein polyklonales Antiserum gegen das rekombinante Protein bindet an die Scheidenoberfläche von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* und läßt auch Mikrofilarien *in vitro* agglutinieren. Dessen intravenöse Injektion in *B. pahangi*- oder *L. sigmodontis*-infizierte, parasitämische *M. coucha* bewirkte eine rasche, effiziente, über 6-7 Tage andauernde Reduktion der Parasitämie (REITZENSTEIN, 2003). Die genomische *Bp-shp6*-Sequenz umfasst die Promoterregion und das 5'-benachbarte Gen, welches eine signifikante Homologie zu einem Nieren-Tumorantigen beim Menschen (NY-REN-45) aufweist.

Analysen zu Klonen, die im Immunoscreen einer cDNA-Expressionsbank von adulten weiblichen *L. sigmodontis* mit dem genannten polyklonalen Antiserum gegen Scheiden identifiziert worden waren, erbrachten Hinweise, dass Spectrin ein Bestandteil der Mikrofilarienscheide ist (DAFFA'ALLA, unveröffentlicht). Unter Verwendung einer entsprechenden *L. sigmodontis*-DNA-Sonde und mittels unterschiedlicher Techniken gelang die Identifizierung der 16 kb großen genomischen Sequenz von *B. malayi*-beta-Spectrin, deren abgeleitete Aminosäuresequenz mit einer Homologie von 86% beta<sub>G</sub>-Spectrin von *C. elegans* entspricht (OBERMEIER, 2002). Im Zuge des Versuches, eine evtl. stadienspezifische Transkription aufzuzeigen, wurden vier alternative Splicingformen identifiziert. Die Transkripte für die Varianten 1-3 wurden bei adulten weiblichen und männlichen *B. malayi* sowie Mikrofilarien nachgewiesen, der Nachweis der Transkription von Variante 4 gelang ausschließlich bei adulten, weiblichen *B. malayi* (OBERMEIER, 2002).

Als weiteres Molekül, das an der Synthese der Mikrofilarienscheide zumindest beteiligt ist, wurde das *L. sigmodontis*-Protein Ls110 identifiziert. Transkription und Translation dieses Proteins erfolgen ausschließlich in Uterusepithelzellen, ausgenommen der Bereiche des Uterus, die an Ovarien und Vagina grenzen. Ls110 ist auch im Lumen des Uterus zu finden. Hier kommt es in direkten Kontakt mit der Oberfläche der Eihüllen bzw. Mikrofilarienscheiden, wobei es zu einer Adsorption an diese Strukturen kommt. Das Protein konnte auf der Eihülle/Scheide unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Mikrofilarien nachgewiesen werden, beginnend mit dem Stadium der späten multizellulären Embryonen bis

hin zu fast vollständig entwickelten Mikrofilarien. Bei komplett ausgereiften, intrauterinen Mikrofilarien und Blutmikrofilarien gelang der Nachweis nicht. Hierfür werden zwei mögliche Ursachen diskutiert: zum einen besteht die Möglichkeit, dass das Protein bei diesen Stadien nicht mehr vorhanden ist, zum anderen wäre denkbar, dass Ls110 zwar vorhanden ist, jedoch von anderen Proteinen und/oder anderen, auf der Scheidenoberfläche vorhandenen Strukturen so verdeckt wird, dass es für Antikörper nicht mehr zugänglich ist, und damit der Nachweis scheitert (DAFFA'ALLA, 1997; DAFFA'ALLA et al., 2000). Die Tatsache, dass es insbesondere im distalen Bereich des Uterus zur Auflagerung unterschiedlicher Substanzen auf die Scheidenoberfläche kommt, ist bekannt (SCHRAERMEYER et al., 1987a; ZAHNER et al., 1995). Gegen die Vermutung, dass Ls110 unter anderen Proteinen in der Scheide ‚versteckt‘ liegt spricht aber, dass es trotz enzymatischer Auflösung der Scheidenoberfläche nicht gelang, Ls110 immunhistologisch nachzuweisen (DAFFA'ALLA et al., 2000). Diese Methode wurde bereits erfolgreich bei der Darstellung von Shp1 angewendet (BARDEHLE et al., 1991).

## **2.5 Die Persistenz der Mikrofilarien und Evasionsmechanismen**

Die persistierende Mikrofilariämie ist ein gut bekanntes und faszinierendes Merkmal von Filarieninfektionen. Dies trifft sowohl für Arten mit bescheideten als auch für solche mit unbescheideten Mikrofilarien zu, aber es scheint, dass sie die Persistenz auf unterschiedliche Art und Weise erreichen. Wenn lebende *A. viteae*-Mikrofilarien in *M. unguiculatus* injiziert werden, können sie noch bis zu 64 Wochen danach isoliert werden. Im Gegensatz dazu überleben *L. sigmodontis*-Mikrofilarien nach Injektion in Baumwollratten nicht länger als 1-3 Wochen (BAYER & WENK, 1988). Dies gilt für *L. sigmodontis* auch im Mausmodell, aber die Anwesenheit von nur einem adulten Weibchen (nicht Männchen) in der Maus erlaubt den übertragenen Mikrofilarien viel längere Zirkulationszeiten (HOFFMANN et al., 2001). Diese zwei Studien zeigen eindeutig, dass das Überleben der bescheideten Mikrofilarien von *L. sigmodontis* entscheidend durch das Vorhandensein adulter Weibchen reguliert wird, die die Immunantwort des Wirtes modulieren, um die Persistenz ihrer Nachkommen zu sichern. Präadulte *L. sigmodontis*-Weibchen produzieren das ES-Protein Juv-p120, dessen posttranslationale Modifikationen (DMAE) mit denen der Scheidenoberflächenkomponenten Shp3 und Shp3a übereinstimmen (vgl. Kapitel 2.4.3.1). Juv-p120 induziert die Bildung von Antikörpern in der Präpatenz, die mit den beiden Oberflächenproteinen kreuzreagieren, aber in der Patenz und Postpatenz nicht mehr nachgewiesen werden. Die Gleichartigkeit der

Modifikationen von Juv-p120 und den Scheidenoberflächenproteinen sowie die Beobachtung, dass mit der Expression von Juv-p120 eine charakteristische Veränderung des Zytokinprofils bei infizierten BALB/c-Mäusen einhergeht [alle geprüften Zytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN $\gamma$ ) mit Ausnahme von IL-10 wurden in dieser Phase nach unten reguliert (TAUBERT & ZAHNER, 2001)], ließ vermuten, dass dem Molekül, evtl. ähnlich Phosphorylcholin-modifizierten Proteinen von Nematoden (HARNETT et al., 1999a), immunmodulierende Eigenschaften zukommen.

Die Prävalenz von Antikörpern gegen die Scheidenoberfläche bei Kindern mit *W. bancrofti* in Indien war nach Untersuchungen von RAVINDRAN et al. (2000) viel höher als bei Erwachsenen. 78% der Kinder unter 10 Jahren hatten solche Antikörper, obwohl Mikrofilarien oder zirkulierende Filarienantigene [nach TURNER et al. (1993) ein definitiver Parameter für Filarieninfektionen bei Menschen] nur bei 4.5% bzw. 22.7% der Kinder nachweisbar waren. Das spricht dafür, dass auch bei dieser Filarie die sich entwickelnden Larven oder die präadulten Stadien als Quelle für Antigene, die Antikörper gegen die Scheidenoberfläche der Mikrofilarien in der Präpatenz induzieren, in Frage kommen. Die Oberflächen uteriner Mikrofilarien von *B. malayi* und *L. sigmodontis* reagierten im IIFT mit Sera aus *W. bancrofti* infizierten Patienten (DIESFELD et al., 1981), aber nicht mit Sera aus *O. volvulus* infizierten Patienten oder *A. viteae* infizierten Hamstern. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikrofilarienscheiden-Oberflächen der drei bescheideten Arten kreuzreagierende Epitope besitzen, wohingegen die Mikrofilarien-Oberflächen bzw. ES-Proteine unbescheideter Arten andersartige Epitope (z.B. Modifikationen) aufweisen.

ZANG et al. (2000) isolierten mit *Bm*-SPN-2 einen Serinprotease-Inhibitor (Serpine) als stark T-Zellen stimulierendes Antigen aus *Bm*-Mikrofilarien. *Bm*-SPN-2 wird von Mikrofilarien sezerniert und blockiert zwei Schlüsselpoteasen von neutrophilen Granulozyten. Weitere immunmodulierende Moleküle, die durch adulte *B. malayi* sezerniert werden (ES-Produkte), sind ein TGF- $\beta$ -Homolog (*Bm*-TGH-2, das an TGF- $\beta$ -Rezeptoren des Wirtes binden kann), ein Cysteinprotease-Inhibitor (Cystatin), *Bm*-CPI-2, der die MHC-II-Antigenprozessierung in humanen B-Zellen hemmt (MAIZELS et al., 2001) und ein Homolog des humanen Migrationsinhibitionsfaktors (MIF), genannt *Bm*-MIF (PASTRANA et al., 1998).

Wie schon oben beschrieben scheinen die unbescheideten Mikrofilarien von *A. viteae* nicht so sehr wie die von *L. sigmodontis* auf das Vorhandensein eines adulten Weibchens angewiesen zu sein, um längere Zeit im Wirt zirkulieren zu können. Mikrofilarien unbescheideter Arten haben offensichtlich zusätzliche Strategien entwickelt, um überleben zu können. Ein Beispiel ist die enzymatische Spaltung von Oberflächen-gebundenen Wirtsantikörpern. Dieses

Phänomen ist für die Mikrofilarien von *A. viteae* und von *D. immitis*, die ebenfalls unbescheidete L1 freisetzen, beschrieben (HAMMERBERG et al., 1984; GATRILL et al., 1991). Eine andere Studie zeigt, dass zwei Oberflächenproteine von *Av*-Mikrofilarien in großen Mengen produziert und als Monomere und Pentamere aktiv in die Umgebung sezerniert werden (APFEL & MEYER, 1990). Sera aus patenten *M. unguiculatus* erkennen zwar diese Proteine, aber nicht die Oberfläche von lebenden Mikrofilarien.

Darüberhinaus sind präadulte und adulte Stadien von Arten, die unbescheidete Mikrofilarien freisetzen, auch in der Lage immunmodulatorische ES-Proteine zu produzieren. ES-62 ist ein PC-haltiges ES-Produkt von *A. viteae*, das bereits gut untersucht wurde (HARNETT et al., 1990; 1993; 1999b; 2003) und die Immunantwort des Wirtes auf verschiedene Weise moduliert. Sein immunmodulatorischer Effekt (es hemmt u.a. die Proliferation von B-Zellen) ist PC-abhängig und konnte durch PC-modifiziertes BSA (PC-BSA) oder PC alleine simuliert werden (HARNETT & HARNETT, 2001).

*A. viteae* und *O. volvulus* können, wie *B. malayi*, Cysteinproteaseinhibitoren (Av17 und Ov17) sezernieren (SCHIERACK et al., 2003). Die immunmodulatorische Wirkung von Av17 beruhte auf einer Suppression der Proliferation von murinen T-Zellen und einer Steigerung der IL-10 Produktion. Ov17 führt zu einer Suppression der spezifischen und unspezifischen Proliferation humaner T-Zellen und einer Steigerung der NO-Produktion von IFN $\gamma$ -stimulierten Makrophagen.

Auch von *D. immitis* konnte ein immunmodulatorisches ES-Produkt identifiziert werden (YAMAOKA et al., 1994). Dieses ES-Produkt modulierte die Funktion von T-Zellen, indem es die Expression von CD23 erhöhte, und die IL-4 induzierte IgE-Synthese in Milzzellen steigerte.

Mehrere Untersuchungen zeigen, dass bei Filarien generell eine pränatale und/oder neonatale Exposition aufgrund einer maternalen Infektion die Immunantwort der Nachkommen beeinflussen kann (OTTESEN, 1980; 1984; 1989; HAQUE & CAPRON, 1982; KLEI et al., 1986; PIESSENS et al., 1987; PETRALANDA et al., 1988; WEIL et al., 1990; BOSSHARDT et al., 1992; STEEL et al., 1994; ELSON et al., 1996).

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Versuchstiere und Parasiten

##### 3.1.1 Mastomys coucha und Meriones unguiculatus, ihre Haltung und Infektion mit Acanthocheilonema viteae

###### 3.1.1.1 Haltung der Versuchstiere

Material:

1. Makrolon®-Käfige Typ II (PAG Presswerk AG, Essen) und Hobelspäneestreu
2. Mischfutter für Syrische Hamster:

Weizen	3.0 g	Hühnervollkorn	2.0 g
Gerste	3.0 g	Garnelen	0.5 g
Mais	2.5 g	Sonnenblumenkerne	2.5 g
Hafer	9.0 g		

Vorgehensweise:

Die afrikanische Vielzitzenmaus *M. coucha* (Stamm „GRA Giessen“) und die Mongolische Rennmaus *M. unguiculatus* dienten als Endwirte.

Die Nager wurden in Makrolon®-Käfigen auf Hobelspäneestreu in klimatisierten Räumen bei ca. 22°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Fütterung erfolgte vormittags mit einem für Syrische Hamster entwickelten Mischfutter. Trinkwasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Zweimal wöchentlich wurden die Tiere in gereinigte, mit frischer Einstreu versehene Käfige umgesetzt.

###### 3.1.1.2 Infektion der Versuchstiere

Material:

1. Lederzecken der Art *Ornithodoros moubata*, die infektiöse Larven III von *A. viteae* enthalten
2. Tyrodelösung: Tyrode-I-Konzentrat: 40 g NaCl (Sigma, Deisenhofen), 1 g KCl (Merck, Darmstadt), 1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt), 0,5 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Sigma, Deisenhofen) mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt; Tyrode-II-Konzentrat: 0,25 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt), 5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt) mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt. Für 500 ml Tyrodelösung wurden 350 ml ddH<sub>2</sub>O mit 50 ml Tyrode-I-Lösung gemischt; anschliessend wurden 50 ml Tyrode-II-Lösung dazugegeben und das Volumen mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt.
3. Gummischlauch, Pasteurpipette und sterile 1 ml Einmalspritzen
4. Injektionskanülen (0,8 x 25 mm)

5. Plastik-Petrischalen (94/16) mit Luftlöchern und kleine Rundfilter (Durchmesser 90 mm, Schleicher & Schuell, Dassel)

Vorgehensweise:

Die Lederzecke *Ornithodoros moubata* diente als Zwischenwirt für *A. viteae*.

Mit *A. viteae* infizierte Zecken wurden freundlicherweise von Richard Lucius (Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie, HU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Zecken waren an infizierten, narkotisierten *M. unguiculatus* oder über Membranfütterung mit Schafblut, dem Mikrofilarien von *A. viteae* zugesetzt waren, infiziert worden.

Die Zecken wurden bei 28°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90% in mit Filterpapier ausgelegten Plastik-Petrischalen (94/16 mm) gehalten.

Die infektiösen Larven 3 wurden 3 Monate p.i. aus den Zecken isoliert. Bei der Sektion der Zecken, die in 37°C warmer Tyrode erfolgte, wurden die in der Hämolymphe befindlichen metazyklischen Larven freigesetzt und unter dem Binokular ausgezählt. Die Larvensuspension wurde mit einer an der Öffnung abgerundeten Pasteurpipette, an der ein Schlauch mit Spritze befestigt war, aufgezogen, direkt in eine 1 ml Einmalspritze übertragen und in einer Dosis von 70 Larven 3/Tier subkutan im Nackenbereich der Tiere appliziert. Als Versuchstiere dienten 4-6 Wochen alte *M. coucha*.

### 3.1.1.3 Blutentnahme und Bestimmung der Mikrofilariendichte

Material:

1. Histaminhydrochlorid, reinst (Merck, Darmstadt)
2. Glaskapillare (Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, 1,35 mm Aussendurchmesser, beidseitig offen; Hirschmann Laborgeräte)
3. Zählkammer nach Jessen mit geschliffenem Deckgläschen 20 x 25 cm, Leukozytenpipette, 3% Essigsäure

Vorgehensweise:

Zur Provokation der Mikrofilariämie wurde den Tieren 30 min vor der Entnahme Histaminhydrochlorid (5 mg/kg KG gelöst in *Aqua dest.*) in den Nackenbereich injiziert. Die Gewinnung von Blut erfolgte durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus im medialen Augenwinkel mittels einer Glaskapillare (näheres über die Blutentnahmetechnik vgl. JUNG, 1962).

Die Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut der Endwirte erfolgte nach der Methode von RAETHER & MAYERHÖFER (1967). Das Blut wurde sofort in eine Leukozytenpipette



aufgezogen und darin 1:10 mit 3% Essigsäure verdünnt. Anschliessend wurden die Mikrofilariendichte mit der Jessen-Kammer ausgezählt.

### 3.1.2 Kaninchen

#### 3.1.2.1 Haltung

Vorgehensweise:

Die zur Herstellung von Antisera eingesetzten Kaninchen der Rasse „Deutscher Riese“ wurden in Boxen auf Einstreu gehalten. Die Fütterung erfolgte mit einem Alleinfutter für Kaninchen (RRF 52 Ringkanin Combi; Raiffeisen, Wiesbaden). Trinkwasser stand in Tränkeflaschen ohne Einschränkung zur Verfügung.

#### 3.1.2.2 Blutentnahme

Material:

1. 70% Ethanol
2. Injektionskanüle (0,9 x 40 mm) und 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc)

Vorgehensweise:

Den Kaninchen wurde das Blut durch Punktion der zentralen Ohrarterie mittels einer Injektionskanüle entnommen. Vorher wurden die Haare an der Einstichstelle ausgezupft und diese mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Das Entnahmevolumen betrug pro Termin 5-20 ml.

#### 3.1.2.3 Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von Antiseren (modifiziert nach COLIGAN et al., 1995)

Material:

1. 1x PBS: 8 g NaCl + 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1 l ddH<sub>2</sub>O, pH 7,3
2. ‚Complete Freund's adjuvant‘ (CFA, Behring, Marburg, 377009A)
3. ‚Incomplete Freund's adjuvant‘ (IFA, Sigma, Deisenhofen, F 5506)
4. STP-Adjuvans: 4 µl Tween 80 (Sigma) + 10 µl Synperonic L61 (Serva) + 100 µl Squalane (Sigma), dann auf 1 ml 1x PBS und 3-5 min vortexen bis eine homogene Emulsion entsteht
5. 200 µg gereinigtes Proteinantigen pro Tier, dialysiert über Nacht bei 4°C gegen 1x PBS
6. Injektionskanülen (0,7 x 25 mm), 1 oder 2 ml sterile Einmalspritzen, 70% Ethanol

Vorgehensweise:

Vor der Immunisierung wurde von jedem Kaninchen Blut entnommen, daraus Serum gewonnen (Kapitel 3.1.3) und dieses bei -20°C aufbewahrt. Um unspezifische Reaktionen der

späteren Antiseren auszuschliessen, wurden die Präimmunseren jeweils im Immunoblot (Kapitel 3.9.1) gegen das zur Immunisierung vorgesehene Antigen getestet. Geeignete Tiere wurden dann für die Immunisierung verwendet.

Für die erste Immunisierung wurden 100 µg gereinigtes Proteinantigen (in 300 µl 1x PBS) mit einem Volumen CFA gemischt (Endvolumen 600 µl). CFA wurde vor der Entnahme geschüttelt, damit sich unlösliche *Mycobacterium tuberculosis*-Bakterien besser verteilen. Es wurde so lange gevortext (ca. 5 Minuten), bis ein homogenes und weisses Gemisch (Öl-in-Wasser-Emulsion) entstand. Um zu testen, ob die Emulsion gelungen war, wurde ein Tropfen des Gemisches auf die Oberfläche von 50 ml kaltem Wasser in einem 100 ml Glasbecher pipettiert. Wenn sich der Tropfen auf die Oberfläche verteilte, wurde nochmals gevortext. Bis zur Immunisierung wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Die CFA-Antigen-Emulsion wurde mittels steriler Einmalspritze und Kanüle subkutan an drei Stellen im Nackenbereich (zwischen den Schulterblättern) vom Kaninchen injiziert, nachdem dieser mit 70% Ethanol desinfiziert worden war. Die erste Booster-Injektion erfolgte in vierwöchigem Abstand mit 50 µg Antigen und IFA. Nach weiteren drei Wochen wurde die Boosterung mit 50 µg Antigen und IFA wiederholt. Alternativ wurde zur Reduzierung der Nebenwirkungen das STP-Adjuvans eingesetzt (modifiziert nach BYARS & ALLISON, 1987; gleiches Volumen wie CFA, nach der Zugabe vom Antigen nur kurz gevortext, Booster-Injektionen wieder mit dem STP-Adjuvans und 50 µg Antigen). Die Blutentnahmen zur Serumgewinnung fanden jeweils 12 Tage nach den Booster-Injektionen statt.

### 3.1.3 Serumgewinnung

Vorgehensweise:

Zur Serumgewinnung wurde das Blut sofort je nach Menge in Eppendorf-Reaktionsgefässe oder 10 bzw. 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gefüllt und nach der Gerinnung (4 h bei Raumtemperatur) und Gerinnselretraktion (über Nacht bei 4°C) 10 min bei 4.000 rpm (JA-20, Beckman) und 4°C zentrifugiert. Vor der Zentrifugation wurde das Gerinnsel vorsichtig von der Wand des Gefässes gelöst. Die abgezogenen Seren wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

## 3.2 **Isolierung und Aufarbeitung von Parasitenstadien**

### 3.2.1 Isolierung adulter *A. viteae*

Material:

1. *M. coucha*, infiziert mit *A. viteae* (60 Tage p.i.)
2. 1x PBS (Kapitel 3.1.2.3)

#### Vorgehensweise:

Mit *A. viteae* infizierte *M. coucha* wurden mit Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) betäubt, dekapitiert und unter Inspektion nach Nematoden-haltigen Knötchen in der Unterhaut enthäutet. Anschliessend wurden das intermuskuläre Fett- und Bindegewebe der Gliedmassen und der Kopfbereich auf weitere Parasiten untersucht.

Die gewonnenen Filarien wurden in Petrischalen mit 1x PBS nach Weibchen und Männchen sortiert und nach Absaugen überschüssiger Flüssigkeit mit Zellstoff bei -70°C eingefroren.

### 3.2.2 Isolierung von *A. viteae*-Mikrofilarien aus Blut

#### Material:

1. *M. coucha*, mit *A. viteae* infiziert (60 Tage p.i.)
2. Glasperlen (0,45 – 0,50 mm Durchmesser, B. Braun Melsungen Apparatebau)
3. Liquemin® (Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach-Whylen)
4. RPMI 1640: 104,3 g RPMI-Pulver mit Glutamin (GIBCO BRL, Eggenstein) ad 10 l Aqua bidest., 20 g NaHCO<sub>3</sub>; auf pH 7,2 eingestellt und steril abgefüllt
5. Percoll (Dichte 1,130 g/ml, Pharmacia, Freiburg)
6. 2,5 M Saccharoselösung (Haushaltszucker)
7. 0,25 M Saccharoselösung

#### Vorgehensweise:

Die Isolierung der Mikrofilarien erfolgte über eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation, modifiziert nach CHANDRASHEKAR *et al.* (1984).

Das Blut infizierter *M. coucha* mit einer Mikrofilariämie von ca. 300 Mff/µl Blut oder mehr wurde in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gesammelt (Kapitel 3.1.1.3), dessen Konus unten zur Hälfte mit Glasperlen versehen war. Unter mehrmaligem Umdrehen des Röhrchens wurde das Blut defibriniert und im Verhältnis 1:1 mit RPMI 1640 verdünnt. Alternativ wurde das Blut auch mit Liquemin® ungerinnbar gemacht (0,2 ml auf 30 ml Blut, vor Blutentnahme in das Röhrchen pipettiert).

Für den Gradienten wurde iso-osmotisches Percoll (IOP) aus neun Teilen Percoll und einem Teil 2,5 M Saccharoselösung hergestellt. Daraus wurden eine 45%ige und eine 40%ige Lösung in 0,25 M Saccharose (v/v) angesetzt. Jeweils 3 ml dieser Lösungen wurden in 10 ml Duran-Glas-Zentrifugenröhrchen geschichtet und mit 0,5 ml verdünntem, defibriniertem Blut überschichtet. Nach Zentrifugation (400 x g, 30 min, ohne Bremse, RT) konnten die

Mikrofilarien, als heller, weisslicher Ring an der Grenzzone erkennbar, mittels einer Pasteurpipette abgesaugt werden. Um eine vollständige Trennung der Mikrofilarien von den Blutzellen zu erreichen, wurde die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation noch einmal wiederholt. Dabei verliert man ca. 10% der Mikrofilarien im Erythrozytenpellet. Zum Schluss wurden die Mikrofilarien je nach gewonnener Menge in 300-400 µl RPMI 1640 aufgenommen, falls notwendig, wie unter 3.1.1.3. beschrieben, gezählt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.3 Einzelwurm-Segmente mit Isolierung der korrespondierenden Embryonalstadien, Wurmabschnitte sowie Gesamt-Embryonalstadien

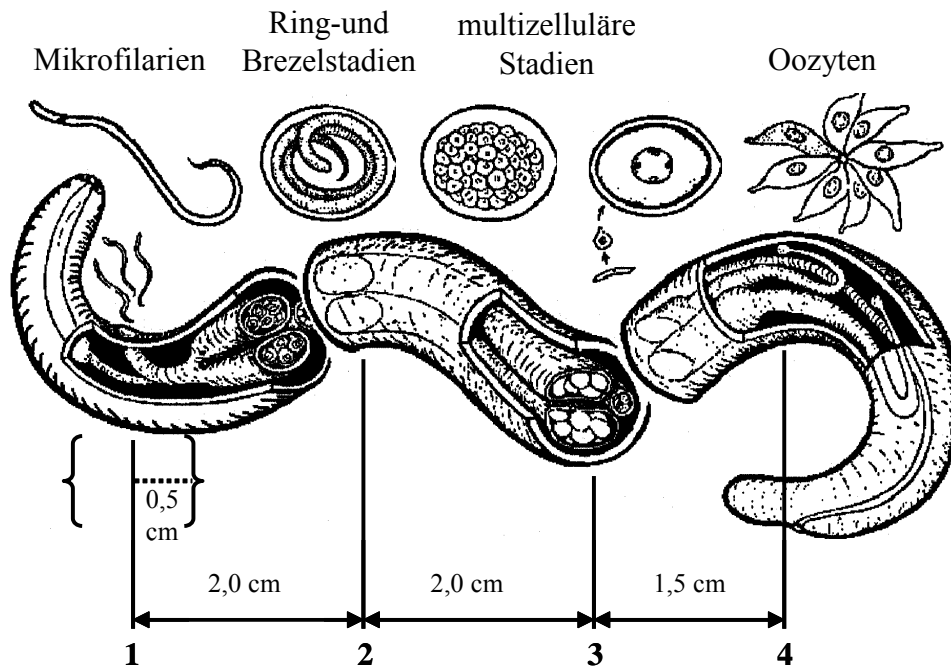
Material:

1. 1x PBS (Kapitel 3.1.2.3)
2. Glasblockschälchen
3. Objektträger (ca. 76 x 26 mm)
4. sterile Rasierklingen
5. Plastik-Petrischale (94/16 mm)
6. Glasplatte und sterile Gaze

Vorgehensweise:

Zur genaueren Lokalisierung der weibchenspezifischen Transkription wurde cDNA aus definierten Einzelwurm-Segmenten und den mit den Segmenten korrespondierenden Embryonalstadien hergestellt. Zu diesem Zweck wurden frisch isolierte, adulte *A. viteae*-Weibchen (ca. 200 Tage p.i., ~ 7 cm lang, Kapitel 3.2.1) einzeln in Glasblockschälchen mit 1x PBS verbracht und 2 h bei 4°C zwecks Immobilisierung inkubiert. Anschliessend wurde jedes Weibchen auf einem Objektträger unter dem Mikroskop orientiert (Vorderende stumpf, Hinterende spitz auslaufend). Die adulten Weibchen wurden in 4 Segmente (1 – 4) geschnitten, die über die Entwicklungsstufen der im Uterus enthaltenen Embryonen definiert wurden (Abb. 3-1). Zuerst wurde der Wurmkörper am Vorderende (ca. auf der Höhe der Genitalöffnung; 1 cm vom apikalen Ende) mit einer frischen sterilen Rasierklinge durchgeschnitten. Danach wurden die geschnittenen Enden etwas umgebogen und darauf 20 bis 30 µl 1x PBS pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden dann zügig die austretenden Mikrofilarien aufgezo-gen. Der Vorgang wurde einmal wiederholt, wobei darauf zu achten war, dass über die PBS die dahinter liegenden Wurmbereiche nicht kontaminiert wurden. Der zweite Schnitt wurde 2,0 cm hinter dem ersten geführt, wonach die austretenden Ring- und Brezelstadien wie oben beschrieben gewonnen wurden. Nach dem dritten Schnitt (weitere 2,0

cm nach hinten) wurden die multizellulären Embryonalstadien gewonnen. Der vierte, etwa 1,5 cm dahinter gesetzte Schnitt diente zur Isolierung der Oozyten. Anschliessend wurden von den so entstandenen Wurmsegmenten 0,5 cm rechts und links des jeweiligen Schnittes abgetrennt (Abb. 3-1). Ein definiertes Einzelwurm-Segment entsprach also dem Bereich, der sich jeweils 0.5 cm rechts und links der Schnittstelle erstreckte. Die daraus resultierenden Einzelwurm-Segmente von 1 cm Länge wurden jeweils in separate 1,5 ml Reaktionsgefässe verbracht und bei -70°C bis zur Verwendung aufbewahrt.



**Abbildung 3-1: Anfertigung der definierten Einzelwurm-Segmente 1 bis 4 und Isolierung der korrespondierenden Embryonalstadien.**

Adulte *A. viteae*-Weibchen wurden in 4 Segmente geschnitten, die über die Entwicklungsstufen der im Uterus enthaltenen Embryonen (über dem Filarienkörper dargestellt) definiert wurden. Horizontale Pfeile sowie eine punktierte Linie (exemplarisch für den ersten Einzelwurm-Segment) geben den Abstand zwischen den Schnitten an. Darstellung in Anlehnung an PLAPPERT et al. (2002) unter Berücksichtigung der Angaben von FRANZ & ANDREWS (1986), FRANZ & BÜTTNER (1986) sowie SCHRAERMAYER et al. (1987b).

Für die Herstellung von Parasiten-Antigen für Immunoblot-Studien wurden Wurmabschnitte (I - V) von mehreren adulten *A. viteae*-Weibchen (ca. 70 Tage p.i.) ohne gleichzeitige Isolierung von Embryonalstadien angefertigt, die anders als die Einzelwurm-Segmente definiert wurden:

- Abschnitt I: 0 – 1 cm vom apikalen Ende
- Abschnitt II: 0,5 cm im Anschluss an Abschnitt I

- Abschnitt III: 0,5 cm im Anschluss an Abschnitt II  
Abschnitt IV: 0,5 cm im Anschluss an Abschnitt III  
Abschnitt V: sich anschliessender Bereich ab 2.5 cm vom apikalen Ende bis zum kaudalen Ende

In diesem Fall wurden neun *A. viteae*-Weibchen aneinander auf einer Glasplatte gelegt und dann die Abschnitte angefertigt. Wie bei der Herstellung von Einzelwurm-Segmenten wurde auch hier für jeden Schnitt eine andere sterile Rasierklinge benutzt.

Gesamt-Embryonalstadien wurden aus ca. 30 adulten *A. viteae*-Weibchen gewonnen. Jeweils 2 bis 3 Würmer wurden auf eine Glasplatte gelegt und mit zwei Tropfen 1x PBS bedeckt. Mit dem Rand einer Plastik-Petrischale wurden die Würmer zerstückelt und mit 1x PBS von der Glasplatte in ein geeignetes Gefäss gespült. Die so entstandene Masse wurde über eine Einzellage Gaze in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gegossen und mit 1x PBS nachgespült. Diese Suspension wurde in ein 10 ml Nunc-Röhrchen gegeben und durch Sedimentation von größeren Partikeln befreit. Anschliessend wurden die Gesamt-Embryonalstadien im Überstand gewonnen, gezählt (Kapitel 3.1.1.3) und auf 200 pro µl mit 1x PBS eingestellt.

### 3.2.4 Herstellung von Proteinhomogenaten (Antigen) aus *A. viteae*

Material:

1. 1x PBS (Kapitel 3.1.2.3)
2. reduzierender Probenpuffer: Roti<sup>®</sup>-Load 1, 4-fach-konz. (Roth, Karlsruhe)
3. 5x Probenpuffer (reduzierend): 5% SDS, 12,5% 2-ME (Serva, Heidelberg), 25% Glycerol und 0,005% Bromphenolblau in 156 mM Tris-HCl pH 6,8
4. 2x Tricin-Probenpuffer: Kapitel 3.8.4

Vorgehensweise:

Die Isolierung der Parasiten erfolgte wie in den Kapiteln 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben. Die Würmer wurden in flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser zu feinem Pulver zerrieben, dann in 1x PBS aufgenommen und mit Ultraschall weiter homogenisiert (10 Zyklen à 20 s, 20 kHz, mit 30 s Intervall auf Eis; Sonifier B-12, Danburg, Connecticut). Definierte Wurmabschnitte wurden in 150 µl 1x PBS in 1,5 ml Reaktionsgefässen mittels eines Mikro-Homogenisator-Stempels zerkleinert (vgl. Kapitel 3.2.3) und anschliessend beschallt. Die Homogenate wurden mit 0,34 Volumen Roti<sup>®</sup>-Load oder 0,25 Volumen 5x Probenpuffer vermischt oder für die Auftrennung in einem Peptidgel in einem Volumen 2x

Tricin-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 100°C erhitzt. Um unlösliche Gewebepartikel zu entfernen, wurde anschliessend 20 min mit 10.000 x g zentrifugiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

Um in PBS lösliche von unlöslichen Proteinen zu trennen, wurde ein zusätzlicher Schritt eingeführt. Das homogenisierte und beschallte Material wurde 10 min mit 13 000 rpm (JA-20, Beckman), 4°C zentrifugiert. Überstand (PBS-löslich) und Pellet (PBS-unlöslich) wurden danach getrennt weiter behandelt.

### 3.3 DNA und RNA

#### 3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *A. viteae* (modifiziert nach SAMBROOK et al., 1989)

Material:

1. DNA-Extraktionspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 M EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS
2. RNase A (Boehringer Mannheim, Mannheim)
3. Proteinase K (Merck, Darmstadt)
4. Phenol (Roti®-Phenol, Roth, Karlsruhe)
5. Chloroform/Isoamylalkohol: Chloroform (Roth, Karlsruhe) wurde mit Isoamylalkohol (IAA, Merck, Darmstadt) in einem Verhältnis von 49:1 gemischt
6. Phenol/Chloroform: Phenol wurde im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol (49/1) gemischt (aufbewahrt bei 4°C)
7. 3 M Natriumacetat (Sigma, Deisenhofen): Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt, die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt
8. Isopropanol (Merck, Darmstadt)
9. TE Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; autoklaviert

Vorgehensweise:

Für die Isolierung der DNA wurden ca. 100 adulte Weibchen (ca. 100 mg, Kapitel 3.2.1) in flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser zu feinem Pulver zerrieben. Dieses wurde in 8 ml DNA-Extraktionspuffer aufgenommen (bis zu 0,1 g Würmer/ml) und anschliessend 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine RNase A-Behandlung (1 h bei 37°C; Endkonz. des Enzyms: 20 µg/ml) und eine Proteinase K-Behandlung (5 h bei 50°C; Endkonz. des Enzyms: 100 µg/ml; langsame Zugabe unter gelegentlichem Mischen). Die klare und visköse Flüssigkeit wurde mit einem gleichen Volumen Phenol vorsichtig gemischt, bis sich eine Emulsion gebildet hatte, und zentrifugiert (5.000 x g, 10 min, 4°C). Die wässrige (obere) Phase wurde mit einer Pipette mit weiter Öffnung in ein neues Gefäss verbracht und weiteren zwei Phenol-Extraktionen unterzogen. Der Überstand der dritten Extraktion wurde zweimal mit

Chloroform extrahiert. Der Überstand der letzten Chloroformbehandlung wurde in ein frisches Gefäß überführt und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol (alternativ 2,5 Volumen Ethanol) versetzt. Nach leichtem Kippen des Röhrchens konnte man die genomische DNA ausfallen sehen. Die präzipitierte DNA wurde mit einem Glashäkchen (angeschmolzene Pasteurpipette) aus der Flüssigkeit gefischt, durch dreimaliges Eintauchen in 1 ml 70% Ethanol gewaschen, ca. 10 min an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und anschliessend in 300 µl TE Puffer bei 4°C über Nacht gelöst. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Kapitel 3.3.3). Die Ausbeute lag bei 1,0 +/- 0,5 mg DNA/g Würmer.

### 3.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. viteae*

Material:

1. Adulte männliche und weibliche *A. viteae* (Kapitel 3.2.1), Mikrofilarien (Kapitel 3.2.2), definierte Einzelwurm-Segmente weiblicher *A. viteae* sowie aus diesen Segmenten stammende Embryonalstadien (Kapitel 3.2.3).
2. Mikro-Homogenisator-Stempel aus Polypropylen, konisch, passend für 1,5 ml Reaktionsgefässe (neoLab, Heidelberg), vor Gebrauch mit 70% Ethanol gereinigt.
3. Denaturierungslösung : 100 g Guanidinium-Isothiocyanat (FLUKA) wurden in der Herstellerflasche mit 126,9 ml H<sub>2</sub>O, 2,6 ml 2 M Na-Citrat, pH 7,0 und 5,3 ml 20% N-Lauroylsarcosin bei 65°C gelöst. Diese Lösung kann 3 Monate bei RT aufbewahrt werden. Zu 50 ml der Vorratslösung werden 360 µl 2-ME zugegeben (kann 1 Monat bei RT aufbewahrt werden)
4. 2 M Natriumacetat, pH 4,0, autoklaviert
5. Phenol (Roth, Karlsruhe): RNA-Qualität, wassergesättigt
6. Chloroform/Isoamylalkohol: Kapitel 3.3.1
7. Isopropanol (Merck, Darmstadt), aufbewahrt bei -20°C
8. 70% Ethanol

Vorgehensweise:

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach der Sauren-Guanidinium-Isothiocyanat-Phenol-Chloroform (AGPC)-Methode (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). Zur Gewinnung von RNA aus Weibchen, Männchen, Mikrofilarien, definierten Einzelwurm-Segmenten oder den Embryonalstadien aus diesen Segmenten wurden die Parasiten oder Parasitenteile in autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefässe verbracht. Die Mikrofilarien und die Embryonalstadien wurden dazu bei 14.000 rpm (SK 54.94/24x3g; Hettich), 2 min, 4°C pelletiert und der Überstand verworfen.

In die Reaktionsgefässe wurden 50 µl der Denaturierungslösung pipettiert und der Inhalt mit dem Mikro-Homogenisator-Stempel (für jede Probe ein Stempel) homogenisiert. Der Stempel



wurde dann mit 100 µl Denaturierungslösung im Reaktionsgefäß abgespült und der Inhalt wurde nochmals homogenisiert. Zu dem Lysat wurden nacheinander folgende Lösungen zugegeben und damit gemischt (bezogen auf 150 µl): 15 µl 2 M Natriumacetat pH 4,0, 150 µl Phenol (RNA-Qualität, wassergesättigt), 30 µl Chloroform/IAA (49:1). Die Mischung wurde 10 s stark geschüttelt, 15 min auf Eis inkubiert und zur Phasentrennung 20 min mit 10.000 x g bei 4°C zentrifugiert (trat keine Phasenbildung auf, wurde mehr Chloroform/IAA zugegeben). Der Überstand (die RNA-haltige wässrige Phase) wurde mit 150 µl Isopropanol versetzt, gevortext, 30 min zum Fällern der RNA bei -20°C inkubiert und anschliessend zentrifugiert (20 min, 10 000 x g, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen (5 min, 13 000 rpm, 4°C). Danach wurde das RNA-Pellet getrocknet (es darf kein Alkohol mehr vorhanden sein) und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Gelagert wurde die RNA bei -80°C.

### 3.3.3 Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Material:

1. Ethanol (96%), aufbewahrt bei -20°C oder Isopropanol (Merck, Darmstadt)
2. 70% Ethanol
3. 3 M Natriumacetat, pH 5,5
4. TE-Puffer: Kapitel 3.3.1

Vorgehensweise:

Zur Fällung von DNA wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,5 und 2,5 Volumen Ethanol (alternativ 0,5 Volumen Isopropanol) zugegeben, vermischt und 20 min bei 13.000 rpm (SK 54.94/24x3g; Hettich) und 4°C zentrifugiert (längere Zeiten bei  $\leq 1$  µg DNA). Der Überstand wurde abgezogen, das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei RT (alternativ 5 min bei 37°C) getrocknet und in der gewünschten Menge TE-Puffer aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Lösungen erfolgte über Absorptionsspektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Absorption bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) wurde mit 50 multipliziert (eine OD von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA) und anschliessend nochmals mit dem Verdünnungsfaktor (i.d.R. erfolgte eine 1:50 Verdünnung) multipliziert. Die DNA-Menge wurde in µg/ml angegeben.

### 3.3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Vorgehensweise:

Die Restriktionsspaltung erfolgte nach Angaben der Hersteller unter Verwendung mitgelieferter 10x Restriktionspuffer. Zur Stabilisierung wurde bei Inkubationszeiten von mehr als 3 h BSA (0,1 mg/ml) zugesetzt. Bei der Spaltung mit zwei Enzymen, die verschiedene Reaktionsbedingungen erforderte, wurde zunächst das Enzym mit den Niedrigsalzbedingungen eingesetzt; nach Inaktivierung (15 min, 80°C) wurden die Pufferbedingung für das zweite Enzym eingestellt. Für die Restriktionsspaltung randständiger Schnittstellen wurde das 2-3fache der Enzymkonzentration verwendet. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde durch 15 minütige Inkubation bei 80°C gestoppt.

#### 3.3.4.1 Spaltung genomischer DNA mit *EcoRI*

Material:

1. *EcoRI* (hc, 60 U/μl, MBI Fermentas, Leon Roth)
2. Puffer: NEBuffer 3 (10x, New England Biolabs, Schwalbach)
3. BSA (100x, 10 mg/ml, New England Biolabs, Schwalbach)

Vorgehensweise:

Für eine Southern Blot-Analyse wurde genomische DNA mit *EcoRI* gespalten. Die Reaktion wurde in 100 μl Volumen mit 5 μg DNA, 1 μl Enzym, 10 μl 10x Puffer und 1 μl BSA (mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf 100 μl aufgefüllt) in 5 h bei 37°C durchgeführt, wobei nach 2,5 h noch 1 μl Enzym zugegeben wurde. Danach erfolgte eine Fällung. Die gespaltene DNA wurde in 15 μl TE-Puffer aufgenommen und anschliessend elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.3.7).

#### 3.3.4.2 Spaltungen und Dephosphorylierung von Plasmid-Vektoren

Material:

1. Plasmidvektor pBluescript<sup>®</sup> SK (+/-) (pBSK, Stratagene, Heidelberg)
2. Plasmidvektor pQE-30 (Typ IV Vektor, Qiagen, Hilden)
3. Alkalische Phosphatase (SAP, USB-Shrimp Alkaline Phosphatase, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 10x SAP-Puffer

Vorgehensweise:

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Subklonierungen wurden in den Plasmid-Vektoren pBSK und pQE-30 durchgeführt (Abb. 3-2 und 3-3).

Plasmid-DNA wurde mit 5-10 U Enzym/μg in einem geeigneten 10x Puffer für eine Stunde bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert (30 bis 50 μl Reaktionsvolumen). Danach erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 80°C in 15 min. Bei einer Spaltung mit

nur einem Restriktionsenzym wurde anschliessend eine Dephosphorylierung mit 1 U ‚Shrimp‘-Alkalische Phosphatase (SAP) pro 2 µg gespaltener DNA (3 kb) für 1 h bei 37°C durchgeführt (verhindert einen Ringschluss durch Ligation der DNA-Enden). Die SAP wurde anschliessend bei 70°C 15 min inaktiviert. Gegebenenfalls erfolgte eine Isolierung der linearisierten Plasmid-DNA nach Agarosegelelektrophorese mittels der ‚Freeze-Squeeze‘-Methode (Kapitel 3.3.8).

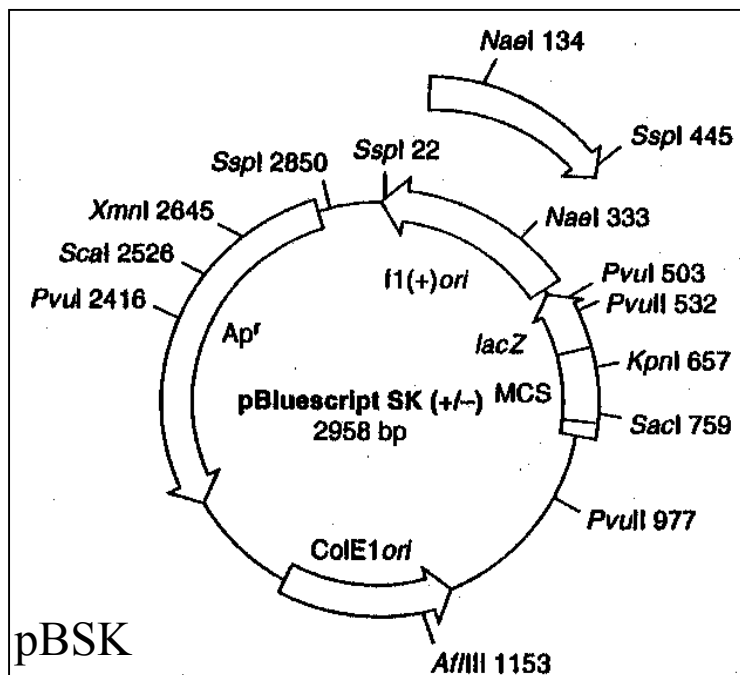
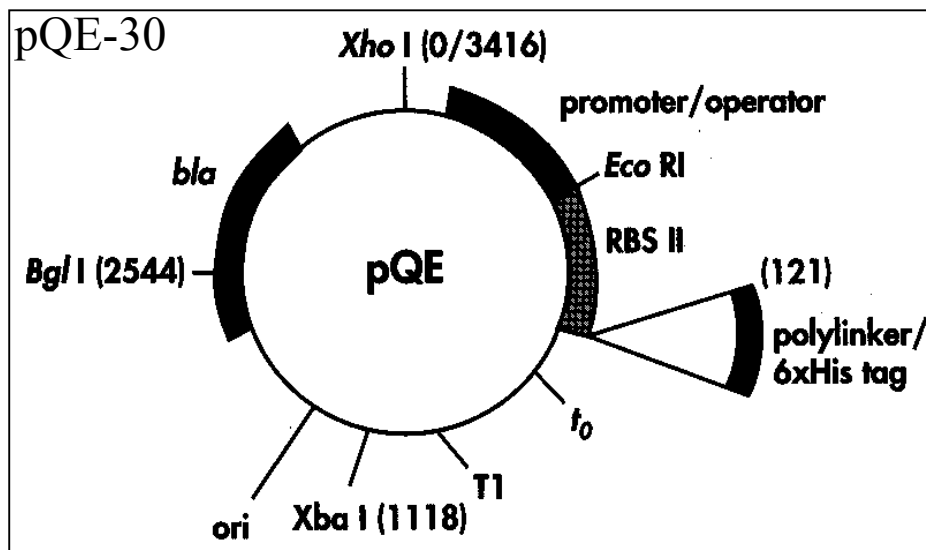
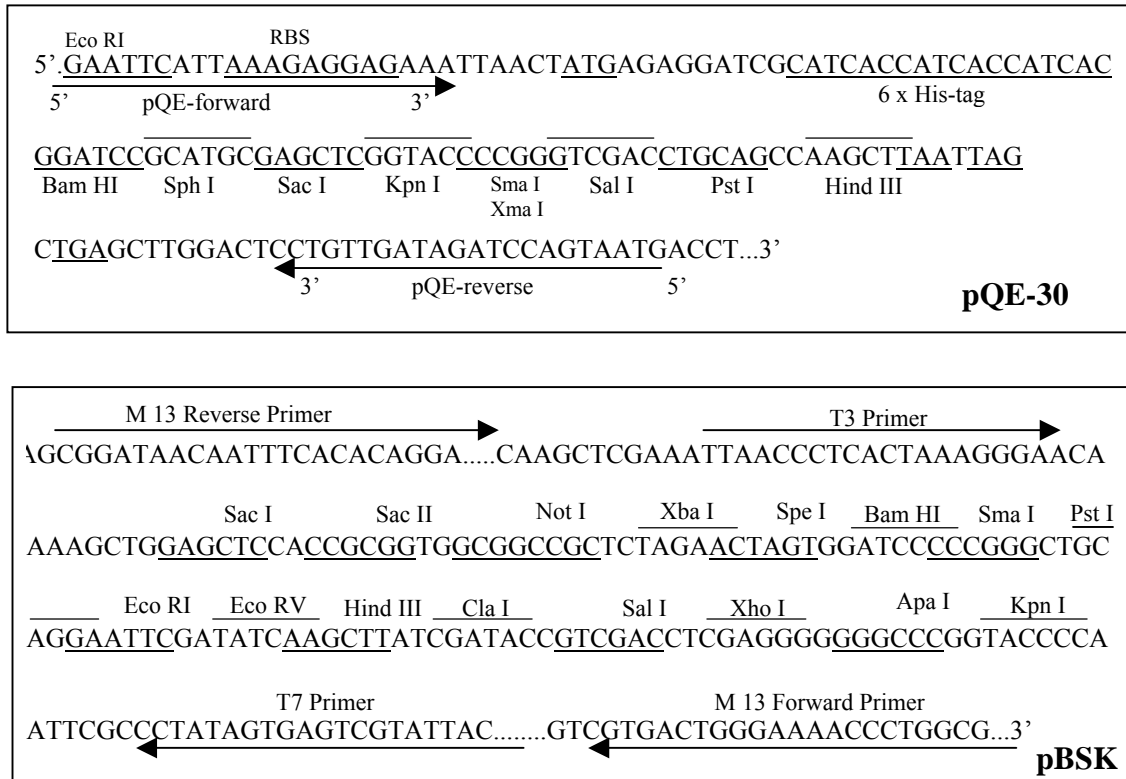


Abbildung 3-2:  
Plasmidkarten von  
pBSK und pQE-30  
(Stratagene,  
Heidelberg bzw.  
Qiagen, Hilden).





**Abbildung 3-3: DNA-Sequenz der MCS („Multiple Cloning Site“) und der flankierenden Bereiche der Plasmid-Vektoren pQE-30 (oben; Qiagen, Hilden) und pBluescript® SK (+/-) (unten; Stratagene, Heidelberg).**

Die Linien ober- bzw. unterhalb der Sequenz zeigen die Restriktionsschnittstellen an, und bei pQE-30 noch zusätzlich die Ribosomenbindungsstelle (RBS), den Start-Codon (ATG), die Abfolge von 6 Histidinen (6 x His-tag) und am Ende 3 Stop-Codons (TAA, TAG und TGA). Die Pfeile über bzw. unter den Sequenzen der für PCR- und Sequenzierungsreaktionen benutzten Oligonukleotide zeigen die Richtung deren Elongation an.

### 3.3.5 Ligation einzelsträngig überhängender DNA-Enden

Material:

1. T4 DNA Ligase (1 U/μl) und 5x DNA Ligase Reaktionspuffer (Gibco BRL, Eggenstein)
2. Plasmid-Vektoren pQE-30 und pBSK (Kapitel 3.3.4.2 und 3.4.4.1)

Vorgehensweise:

Die Ligation wurde mit 1 μl T4 DNA Ligase, 3 μl 5x Ligationspuffer und Fragment/Vektor in einem molaren Verhältnis von 3:1 (0,1 bis 0,5 μg Total-DNA) in einem Reaktionsvolumen von 15 μl über Nacht bei 12°C (alternativ 1 h bei RT) durchgeführt. Für die meisten Reaktionen wurde eine Standardmenge von 100 ng Vektor-DNA eingesetzt und die Menge an Insert-DNA (X) mit der folgenden Formel berechnet:

$$X \text{ ng Insert-DNA} = \frac{(\text{Grösse Insert-DNA in bp}) \times (100 \text{ ng Vektor})}{(\text{Grösse Vektor-DNA in bp})} \times 3$$

### 3.3.6 Sequenzierung und verwendete Oligonukleotide

Vorgehensweise:

Alle Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden von SEQLAB (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden nach Kapitel 3.4.4.2 gewonnene Plasmid-DNA und nach Kapitel 3.6.1 aufgereinigte PCR-Produkte eingesetzt. Die notwendige Menge DNA (Plasmid-DNA: 0,6 μg; PCR-Produkte: ~1000 bp: 200 ng, ~500 bp: 100 ng, ~200 bp: 40 ng) wurde mit 20 pmol eines geeigneten Primers (18 bis 22 bp,  $T_m = 52\text{-}60^\circ\text{C}$ ) in einem 0,2 ml PCR-Gefäss in einem Volumen von 7 μl mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gemischt und eingeschickt. Es wurden i.d.R. ca. 600 bp pro Sequenzierung gelesen („Extended Hot Shot“). Alle Oligonukleotide und Oligonukleotidgemische, die im Rahmen dieser Studie für die Sequenzierungen, Reverse Transkriptionen und PCR-Amplifikationen verwendet wurden, sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Alle Oligonukleotide wurden nach eigenen Vorgaben von MWG Biotech (Ebersberg) und Sigma (Darmstadt) synthetisiert. Die Primer wurden in 300 μl sterilem ddH<sub>2</sub>O durch Vortexen gelöst (Stammlösung); von dieser Lösung wurde eine 1:200 Verdünnung angefertigt. Nach einer spektrophotometrischen Messung bei 260 nm Wellenlänge wurde die Konzentration der Stammlösung nach folgender Formel berechnet:

$A_{260\text{nm}} \times 200 \text{ (Verd.)} \times 100$

———— = pmol/μl Stammlösung

Nukleotidenanzahl (bp)

Aus dieser Stammlösung wurde eine 15 pmol/μl-Arbeitslösung in sterilem ddH<sub>2</sub>O hergestellt.

**Tabelle 3-1: Für Sequenzierungen, Reverse Transkriptionen und PCR-Amplifikationen verwendete Oligonukleotide:**

Name	Gen/Spezies, Verwendung	Orientierung	Sequenz (5' → 3'), Position	Länge/ T <sub>m</sub> (4+2)
T7	Vektor	anti	GTAATACGACTCACTATAGGGC	22/64
T3	Vektor	sense	AATTAACCCTCACTAAAGGG	20/56
M 13 F.	Vektor	anti	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	24/78
M 13 R.	Vektor	sense	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	24/68
pQE-f.	Vektor	sense	GAATTCATTAAAGAGGAGAAA	21/54
pQE-r.	Vektor	anti	CATTACTGGATCTATCAACAGG	22/62
dT24VN	RT-PCR	-	T <sub>24</sub> VN	26/52
dT21-Sal/Xho	PCR	-	atactcgcagtcgcacT <sub>21</sub> (XhoI- u. SalI-Adapter)	35/42(84)
SL-1	SL	sense	tatctcgcagGTTTAATTACCCAAGTTTG (XhoI-Adapter)	28/50(76)
Bm-Aktin 5'	Aktin/Av, Ls, Bm	sense	GGGTGACGAAGAAGTAGCGGCTCTTG	26/82
Bm-Aktin 3'	Aktin/Av, Ls, Bm	anti	GCCGATAGTGATGACCTGTCCATCC	25/78
Pro1	shp3, 3a/ Av, Ls, Bm	sense	CCGCTTTCYGAAGCTTTGGATGAG, -3976	25/76
WCW3	shp3, 3a/ Av(3a), Ls, Bm	anti	TGRAKACCACCAACACCACCA, 2516	21/64
Av-Pro5	shp3, 3a/Av	sense	TGTGAGGTCTTTAGTGTGATAC, 9224	22/62
Av-Pro4	shp3a/Av	anti	GTTGGCCGACTCATGCGAATGTA, 3829	23/70
Av3-1	shp3a/Av	sense	GTTTGCTTGAAAATGGGAAG, -3699	20/56
Av3-2	shp3a/Av	anti	CTGTCGTTACTGCAGATTCTG, 2710	21/62
Av3-3	shp3a/Av Klonierung	sense	cgggaatTCACAAAGCAGCAATTCAAC, -2834 (EcoRI-Adapter)	26/56(74)
Av3-3-II	shp3a/Av Klonierung	sense	cgggaattcTCACAAAGCAGCAATTCAAC (EcoRI-Adapter), -2836	28/56(80)
Av3-exp s	shp3a/Av Klonierung	sense	cgggatccCCTCAACCAGGAAAACCTC, -2575 (BamHI-Adapter)	26/54(92)
Av3-exp a	shp3a/Av Klonierung	anti	tgtatgCATACATGTAATCCGAATTT, 2461 (NsiI-Adapter)	26/52(68)

Av3-4	shp3a/Av	anti	TACTCAATCGATTGATCATTCTGA, <sup>2362</sup>	23/62
Av3-5	shp3a/Av	sense	TGTATTGAACCTGTGGAATTCA, <sup>-2469</sup>	22/60
Av3-13	5'C29F5.1/Av	sense	TAAATAATGCTAAGTAATGTCCT, <sup>377</sup>	23/58
Av 3-3'	C29F5.1-shp3a, Intergen3Exon/Av	anti	GGTAATCAATTTCGAAATACTA, <sup>-1512,</sup> <sup>5523</sup>	21/54
Av3-12	C29F5.1-shp3a, 4395identisch/Av	anti	TTCCAGGAAGAGTTCCTCTAT, <sup>-1996,</sup> <sup>4395</sup>	21/60
Av3-11	shp3a-Intergen/ Av	sense	TTGCTCAGAATGAAGTCACTG, <sup>4275</sup>	21/60
Av3-18	shp3a-Intergen/ Av	sense	AGAACTCGCAAATCCGTTAAT, <sup>4789</sup>	21/58
AvIs	Intergen/Av,Ov	sense	GTGTGGTACTGTTTATATCAAT, <sup>5205</sup>	22/58
Av19	Intergen/Av	sense	TAAGTGTTCCTGTAAGTTATAC, <sup>5259</sup>	22/58
Av15	Intergen, 8660 homolog/Av	anti	ACCTGCTTATAACAACGATAGA, <sup>-5909,</sup> <sup>-8660</sup>	22/60
Av-Pro7	Intergen/Av	anti	TCTGCAACATATTTCAAGCAGT, <sup>-6407</sup>	22/60
Av3-10	Intergen/Av,Ov	sense	ATCTTCGATCACATTGGCGTAA, <sup>6702</sup>	22/62
Avlas	Intergen/Av,Ov	anti	TTGCATTTAATAGATTACCGCT, <sup>-6912</sup>	22/58
Av16	Intergen-shp3/ Av, 4932 hom.	sense	TGCGCTATCCAGAACAGATAA, <sup>7214,</sup> <sup>4932</sup>	21/60
Av20	Intergen-shp3/ Av	anti	CAGTTCATCATTCATTTCAAAG, <sup>-8080</sup>	22/58
Av17	Intergen-shp3/ Av	anti	GTCTTTCAAATCTTTCATATGA, <sup>-8576</sup>	22/56
Av-Pro6	Intergen-shp3/ Av	anti	GTACAAAGAAATTATGTACTCG, <sup>-9040</sup>	22/58
Av3-9	shp3(a)/Av	sense	GGCATATTTCAATCGAAGTGAA, <sup>9403 (-3817)</sup>	22/60
Av3-8	shp3-Promoter- Ende	anti	CGTAGCCTCATTTGATTATGGAT, <sup>-10469</sup>	22/62
Ov2	C29F5.1/Ov, Av, Ls, (Bm)	sense	GAATTGGCTCATATCAATGGTA, <sup>173</sup>	22/60
Ov5	C29F5.1/Ov	sense	CGGTGTGATTATATACGATGT, <sup>661</sup>	21/58
Ov6	C29F5.1/Ov	sense	CAGCCATATTAGCTGCACAT, <sup>1125</sup>	20/58
Ov-Sc3	C29F5.1/Ov	anti	TTTGACCTCGCTTTCGTCAT, <sup>-1835</sup>	20/58
Ov-Sc2	C29F5.1/Ov	anti	ATTATCTTCATCAACATTGTTG, <sup>-2523</sup>	22/56
Ov-Sc	C29F5.1/Ov	anti	TGAAGAATGGAAATCCAGCAC, <sup>-2768</sup>	21/60
Ov8	C29F5.1/Ov	sense	TCCGAATTTAAATGTGCTTTG, <sup>3102</sup>	21/56
Ov11	C29F5.1/Ov	sense	CGTAAACTAGAGATTGAGTTT, <sup>3583</sup>	21/56
Ov10	C29F5.1- Intergen/Ov	anti	GCTCGAGTAAGTTATGCTGGT, <sup>-4354</sup>	21/62
Ov9	5'Intergen/Ov	anti	TTACCAAGCATCAAGAAAGTG, <sup>-4862</sup>	21/58
Ov4	Intergen/Ov	anti	GTGGAGGCAAATATTGCCAG, <sup>-5366</sup>	21/64

Ov3	Intergen/Ov	anti	TTGAACTGATTATCTGATGTAG, -5600	22/58
Ov1	Intergen/Ov, Av, Ls, (Bm)	anti	TGCCACAGTTGTTATCATGCT, -6073	21/60

### 3.3.7 Agarosegel-Elektrophorese

#### Material:

1. Agarose (Elektrophoresis Grade, ICN Biomedicals, Eschwege)
2. TAE (50x)-Puffer: 2 M Tris (242 g/l, ICN), 50 mM EDTA (18,6 g/l, Sigma), 0,5 M Natriumacetat (68 g/l), pH 8,3 (mit Essigsäure, Merck)
3. Ethidiumbromidlösung: Die Stammlösung mit 10 mg Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg) pro ml ddH<sub>2</sub>O wurde im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt; die Gele wurden in einer Lösung von ca. 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer im Dunkeln bei RT gefärbt
4. Gel-Ladepuffer (10x): 5 ml Glycerol (Ultra Pure, ICN), 100 µl gesät. Bromphenolblaulösung (BPB, Merck, Darmstadt), 100 µl 10%ige Xylencyanol FF (XC-FF, Sigma, Deisenhofen)-Lösung, 2 ml 0,5 M EDTA (Sigma), 1 ml 10x TAE, mit H<sub>2</sub>O ad 10 ml
5. Molekulargewichtstandards: M1: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, in kB), 10/8/6/5/4/3,5/3/2,5/2/1,5/1,2/1,031/0,9/0,8/0,7/0,6/0,5/0,4/0,3/0,2/0,1 und M2: λE+H=λcI857 EcoRI- plus HindIII-Spaltung (Boehringer Mannheim, in bp), 23130/21226/9416/7421/6557/5804/5643/4878/4361/3530/2322/2027/564/125

#### Vorgehensweise:

DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in Agarose-Gelen ihrer Grösse entsprechend aufgetrennt, um Reaktionen wie z.B. PCR, Plasmidisolierung oder Restriktionsspaltungen zu kontrollieren. Die Elektrophorese wurde in Horizontal-Apparaturen eigener Herstellung durchgeführt (Gelgrössen: Minigel 7,5 x 5,0 x 0,4 cm und Midigel 14 x 11 x 0,4 cm; LxBxH). Der Grösse der erwarteten DNA-Fragmente entsprechend wurden 0,5 – 1,6%ige Agarose-Gele verwendet. 0,5% bis 1,6% Agarose in 1x TAE-Puffer wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und in den Gelschlitten gegossen, in den ein Teflonprobenkamm eingesetzt war. Zum Laden wurden die Proben mit 1/10 Volumen Gel-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 120 V für 45 min (Minigel) in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Als Kontrolle für den Verlauf der Elektrophorese diente die Farbstoffbande des Ladepuffers. Die DNA-Fragmente wurden im Gel nach Anfärbung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 min und anschliessend dreimal mit Wasser gewaschen) unter UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und photographiert. Anhand der Molekulargewichtstandards wurde die Grösse der Fragmente bestimmt.



### 3.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

#### Material:

1. Sterile Skalpell- oder Rasierklinge
2. Taschen aus Parafilm: Durch Falten eines 5 x 10 cm grossen Stückes Parafilm und Verschliessen der Seitenränder durch Andrücken wurden kleine, an 3 Seiten verschlossene und an einer Seite offene Taschen hergestellt
3. Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt)
4. Chloroform/Isoamylalkohol: Kapitel 3.3.1
5. Phenol/Chloroform: Kapitel 3.3.1
6. 3 M Natriumacetat pH 5,5, Ethanol (96% und 70%) (Kapitel 3.3.3)

#### Vorgehensweise:

Nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente auf einem präparativen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.3.7). Nach der Färbung im Ethidiumbromid-Bad und anschliessender Kontrolle mittels einer UV-Lampe (360 nm; dabei wurde die zu isolierende Bande markiert) wurde das Gelstückchen mit einer sterilen Skalpell- oder Rasierklinge möglichst eng um die Bande ausgeschnitten und in eine Parafilmtasche verbracht. Nach einer Inkubation bei -80°C für 15 min wurde der gefrorene Gelstreifen in der Hand kurz aufgetaut, die Flüssigkeit durch leichten, gleichmässig verteilten Druck abgepresst, abpipettiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäss transferiert. Es folgte eine Extraktion mit einem Volumen Isoamylalkohol (Mischen durch Vortexen, Zentrifugation mit 10.000 x g für 2 min). Die obere Schicht wurde verworfen und die untere wässrige, die DNA enthaltende Phase in ein neues Gefäss überführt. Nach einer Phenol/Chloroform- und einer Chloroform/IAA-Extraktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.3.9 Southern Blot-Analyse genomischer DNA

(nach SOUTHERN, 1975)

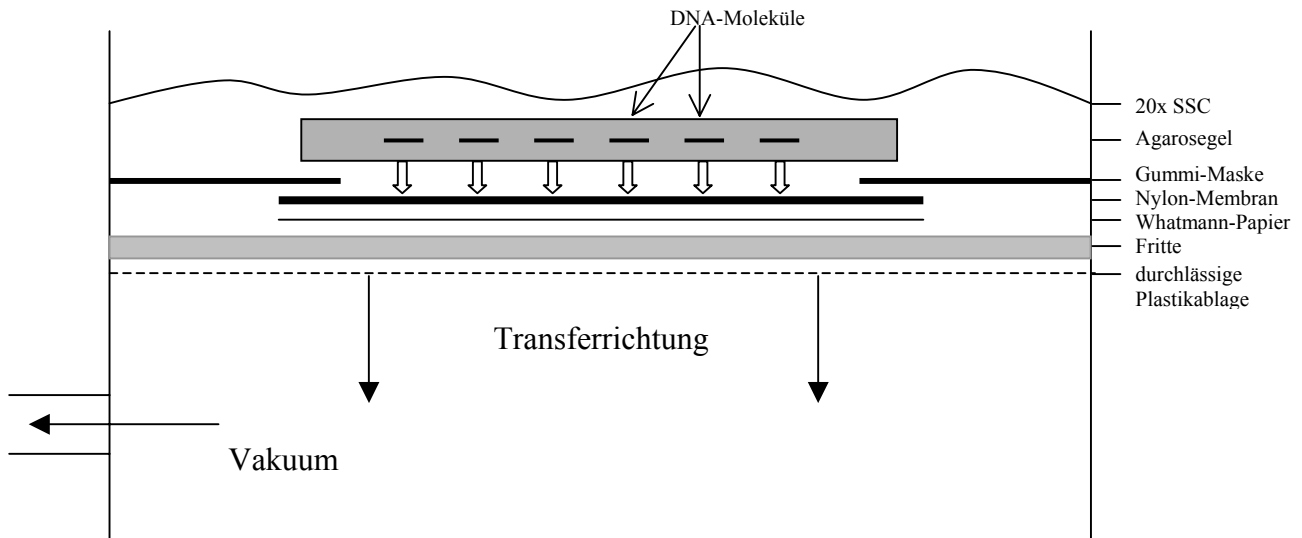
#### Material:

1. Ethidiumbromidlösung: Kapitel 3.3.7
2. Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
3. Depurinierungslösung: 0,25 M HCl: 1 Teil 36% HCl + 45,4 Teile ddH<sub>2</sub>O
4. Biodyne® A Nylonmembran (Pall GmbH Filtrationstechnik, Dreieich) und Whatmann-Filterpapier (dünn): beide allseits ca. 0,5 cm grösser als das Gel zugeschnitten
5. Gummi-Maske mit einem Fenster in Gelform, aber allseits 0,5 cm kleiner
6. SSC (20x): Kapitel 3.5.2.2
7. 1% Agarose in 1x TAE-Puffer (Kapitel 3.3.7)

8. Lösungen für die Hybridisierung (Kapitel 3.5.2.3)
9. Chemilumineszenz-Substrat: CDP-Star<sup>TM</sup> Chemilumineszenz Substrat (New England Biolabs, Schwalbach): 1:250 Verdünnung von CDP-Star<sup>TM</sup> in 1x Assay-Puffer (0,025-0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran)
10. Plastikfolie (Polystar PE-Schlauchfolie, Rische & Herfurth, Hamburg)
11. Frischhaltefolie
12. Aluminiumfolie
13. Kodak BioMax Light Film (BioMax Light-1, Sigma)

#### Vorgehensweise:

Agarose-Gele mit elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsspaltprodukten genomischer DNA (Kapitel 3.3.4 bzw. 3.3.4.1 und 3.3.7) wurden nach Färbung in Ethidiumbromid zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal unter UV-Licht photographiert, um später die Grösse der hybridisierenden DNA-Fragmente anhand der Laufstrecke der Markerfragmente bestimmen zu können. Vor dem Transfer wurde das Agarose-Gel zur Depurinierung der DNA zweimal 10 min in 0,25 M HCl-Lösung und zweimal 15 min in Denaturierungslösung bei RT in einer Glaswanne geschwenkt. Auf die Vakuumkammer (TE80 Transvac, HOEFER) wurden ein in 20x SSC getränktes Whatmann-Papier, dann darauf die Nylon-Membran (vorher in H<sub>2</sub>O und 2x SSC getaucht), dann die Gummi-Maske und zum Schluss darauf das Gel gelegt, welches an allen Seiten 0,5 cm grösser war als die Maske, damit ein ausreichendes Vakuum entstand (Abb. 3-4). Die Gelränder und Probestaschen wurden mit 1% Agarose abgedichtet, die Pufferkammer mit der Vakuumkammer durch Klammern fixiert und ein Unterdruck von 0,6 Bar (Vakuumpumpe PV100 Red-Evac, HOEFER) angelegt. Die Pufferkammer wurde anschliessend mit 20x SSC bis über das Gel gefüllt. Nach einer Transferzeit von 1 h wurden die Auftragstaschen auf der Membran mit einem Bleistift gekennzeichnet und beschriftet. Zur Transferkontrolle wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Membran wurde in 2x SSC gewaschen und zur Fixierung der DNA 1 h bei 80°C zwischen zwei dicken Whatmann-Papieren in Aluminiumfolie inkubiert. Die Hybridisierung wurde nach Kapitel 3.5.2.3 durchgeführt. Wenn eine Kreuzhybridisierung erwünscht war, wurden die Hybridisierung bei 45°C und der 3. Waschschrift bei 50°C mit 0,4x SSC (niedrigere Stringenz) durchgeführt. Nach der Äquilibration im Substrat-Puffer wurde die Membran in Plastikfolie mit 10 ml Chemilumineszenz-Substrat eingeschweisst und 5 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und dann für 30 s, 5 und 10 min mit einem ‚BioMax Light‘ Film exponiert. Nach dem Auflegen des Filmes auf die Membran wurden dessen Ränder mit Farbstift markiert, damit nachher die Markierungen der Auftragstaschen auf den Film übertragen werden konnten.



**Abbildung 3-4: Funktionsweise einer Vakuumkammer für Southern-Transfers**

### 3.3.10 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin-dUTP

Material:

1. ‚DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive‘ (Boehringer Mannheim, Mannheim):
  - 1.1) 10x Hexanukleotid-,Mix‘: 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTE, 3,143 mg/ml p(dN)<sub>6</sub>, 2 mg/ml BSA
  - 1.2) 10x DIG-dNTP-,Mix‘: 1 mM dATP/dCTP/dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP, pH 6,5
  - 1.3) Klenow-Enzym (2 U/ µl)
2. 0,2 M EDTA, pH 8,0, 4 M LiCl und Ethanol (96% und 70%, -20°C), TE-Puffer, pH 8,0

Vorgehensweise:

Die Markierung mit Digoxigenin-dUTP wurde modifiziert nach dem Protokoll aus dem ‚DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive‘ (Boehringer Mannheim) durchgeführt. 6 µl DNA (ca. 1 µg, aufgereinigtes PCR-Produkt), 2 µl 10x Hexanukleotid-,Mix‘ und 9 µl ddH<sub>2</sub>O (insgesamt 17 µl) wurden 10 min im Wasserbad gekocht (Denaturieren der DNA), dann sofort für 10 min in Flüssig-Stickstoff inkubiert und anschliessend auf Eis gestellt. Zu dieser Lösung wurden 2 µl 10x DIG-dNTP-,Mix‘ und 1 µl Klenow (2 U/µl) pipettiert und mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 2 µl 0,2 M EDTA gestoppt, und die markierte DNA wurde mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl Ethanol (96%, -20°C) gefällt (30 min bei -70°C oder 2 h bei -20°C). Es folgten eine Zentrifugation (12.000 x g, 20 min), Waschen des Pellets mit 300 µl kaltem 70% Ethanol, Trocknen des Pellets für 10 min bei RT und Aufnahme in 50 µl TE-Puffer. Eine annäherungsweise Bestimmung des Markierungseffekts war durch einen Vergleich mit im Kit enthaltener markierter Kontroll-DNA möglich.

Weitere Möglichkeiten der Markierung ergeben sich mit Hilfe der PCR (Kapitel 3.6.3).

### 3.4 Bakterien (*E. coli*)

#### 3.4.1 Anzucht und Aufbewahrung

Material:

1. *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg): recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10, (Tet<sup>r</sup>)]; als Glycerinkultur bei -80°C aufbewahrt
2. *E. coli* Stamm M15[pREP4] (QIAexpress Empfänger-Stamm, Qiagen, Hilden): auf der Basis von *E. coli* Stamm K12 (Nal<sup>s</sup>, Str<sup>s</sup>, Rif<sup>s</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>); als Glycerinkultur bei -80°C aufbewahrt
3. Luria Broth Base Medium (LB, Life Technologies, Gibco BRL, Eggenstein): 25 g Medium auf 1 l ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert und aufbewahrt bei Raumtemperatur
4. Runde LB-Agar-Nährplatten: 1 l LB + 18 g Agar (1,8%, Life Technologies, Gibco BRL, Eggenstein), autoklaviert und in 94/16 mm Platten (ca. 20 ml pro Platte) gegossen; in Sterilbank mit geöffnetem Deckel stehen gelassen bis zur Aushärtung des Agars (ca. 30 min); verschlossen aufbewahrt bei 4°C für 4 Wochen verwendbar.
5. Glycerin (Glycerol Ultra Pure, ICN Biomedicals, Eschwege)

Vorgehensweise:

Bakterien wurden ausgehend von einer Einzelkolonie oder einem Ausstrich aus einer Glycerinkultur in LB-Medium bei 37°C angezogen. Die Aufbewahrung erfolgte als Ausstrich auf (Antibiotika)-LB-Agarplatten (1-2 Monate) und als 15% Glycerinkultur bei -80°C.

#### 3.4.2 Herstellung kompetenter Zellen

Material:

1. *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg): recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10, (Tet<sup>r</sup>)]; als Glycerinkultur bei -80°C aufbewahrt
2. *E. coli* Stamm M15[pREP4] (QIAexpress Empfänger-Stamm, Qiagen, Hilden): auf der Basis von *E. coli* Stamm K12 (Nal<sup>s</sup>, Str<sup>s</sup>, Rif<sup>s</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>); als Glycerinkultur bei -80°C aufbewahrt
3. LB-Medium (Kapitel 3.4.1)
4. LB-Medium (+ Kanamycin): LB-Medium mit Zugabe von Kanamycin (Stammlösung 25 mg/ml H<sub>2</sub>O, -20°C) mit einer Endkonzentration von 25 µg/ml, aufbewahrt bei 4°C innerhalb von 2 Wochen verwendet
5. CaCl<sub>2</sub>-Puffer: 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, nach Autoklavieren bei 4°C aufbewahrt

Vorgehensweise:

10 ml LB-Medium (bei *E. coli* M15[pREP4] LB-Medium mit Kanamycin) wurden aus einer Bakterien-Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und kräftigem Schütteln

inkubiert. Der *E. coli*-Stamm M15 enthält in niedriger Kopienzahl das pREP4-Plasmid mit einem Kanamycin-Resistenz-Gen und dem Gen für den lac-Repressor, welcher die Expression rekombinanter Proteine streng reguliert.

Mit 1 ml der Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 100 ml LB-Medium und LB-Kanamycin angeimpft und bei 37°C und Schütteln bis zu einer optischen Zelldichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann für 10 min auf Eis gestellt und anschliessend mit 4.000 rpm (JA-20, Beckman) 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Bakterienpellet vorsichtig in 30 ml kaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert und auf Eis bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde vor der Transformation nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 3 ml kaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden bis zur Transformation immer auf Eis gehalten.

### 3.4.3 Transformation

Material:

1. *E. coli*-Stämme XL-1 Blue und M15[pREP4], kompetente Zellen (Kapitel 3.4.2)
2. SOC-Medium (10 ml): 9,6 ml LB + 100 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> (10 mM) + 100 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> (10 mM) + 0,2 ml 20% Glucose (0,4% Endkonz., sterilfiltriert), pH 7,0 (mit NaOH eingestellt)
3. 1 M Stammlösung IPTG (Roth, Karlsruhe) in H<sub>2</sub>O, bei -20°C aufbewahrt
4. 50 mg/ml Stammlösung X-Gal (Roth, Karlsruhe) in DMF, bei -20°C aufbewahrt
5. Kontroll-Plasmid
6. Runde LB-Agar-Nährplatten [ + Ampicillin, + Kanamycin (nur bei *E. coli* M15, Kapitel 3.4.2), + IPTG, + X-Gal (IPTG- und X-Gal-Zugabe entfällt bei der Verwendung von *E. coli* M15 bzw. von dem Plasmid pQE-30, Kapitel 3.4.4.1) ]: 200 ml LB-Agar wurde wie im Kapitel 3.4.1 hergestellt. Nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von 200 µl Ampicillinlösung (Stammlösung 50 mg/ml H<sub>2</sub>O, aufbewahrt bei -20°C, Endkonz. 50 µg/ml), 200 µl Kanamycin ( nur bei M15, Kapitel 3.4.2), 400 µl X-Gal (0,01% Endkonz.) und 100 µl 1 M IPTG (0,5 mM Endkonz.). Der flüssige Agar wurde in Ø 94/16 mm Platten gegossen (ca. 20 ml pro Platte). Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4°C aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen verbraucht.

Vorgehensweise:

150 µl der Suspension kompetenter Zellen wurden mit 7,5 µl von einem Ligationsansatz (Kapitel 3.3.5) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäss vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschliessend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s (alternativ bei 37°C für 5 min), gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis für 5 min. Zu jedem Ansatz wurden 500 µl SOC-Medium dazugegeben und die Gefässe kurz geschwenkt. Die Mischung wurde für 5 min in ein 37°C Wasserbad gestellt und anschliessend unter leichtem Schütteln (160-170 rpm)

1 h bei 37°C inkubiert (Regeneration und Expression der Antibiotika-Resistenzgene). Die transformierten Bakterien wurden sodann mit 1.400 x g 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl verworfen, das Pellet in dem verbliebenen Mediumrest resuspendiert und auf den Agarplatten (+ Ampicillin, ggf. + Kanamycin, ggf. + IPTG und X-Gal) ausplattiert. Die Platten wurden umgedreht bei 37°C über Nacht inkubiert.

Parallel dazu wurde eine positive Kontrolle durchgeführt, um die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen zu überprüfen. Die kompetenten Zellen wurden mit 1 ng unverdaulichem Kontrollplasmid in 20 µl TE-Puffer transformiert; eine 1:100- und 1:10-Verdünnung davon wurde ausplattiert. Die zu erwartende Transformationseffizienz liegt bei 10<sup>6</sup> Kolonien/µg supercoiled Plasmid-DNA.

### 3.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

#### 3.4.4.1 Plasmid-Minipräparation zur Analyse rekombinanter Klone (modifiziert nach BIRNBOIM & DOLY, 1979)

Material:

1. LB-Medium (+ Ampicillin): LB-Medium (Kapitel 3.4.2) + Ampicillin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml (Stammlsg. 50 mg/ml H<sub>2</sub>O, -20°C)
2. Lösung I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA
3. Lösung II: 0,2 M NaOH, 1% SDS
4. Lösung III: 3 M Kaliumacetat, auf pH 4,8 mit Eisessig eingestellt
5. Isopropanol (Merck, Darmstadt)
6. RNase A (Boehringer Mannheim, Mannheim)
7. Holzzahnstocher, autoklaviert

Vorgehensweise:

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmidvektor pBluescript<sup>®</sup>SK (+/-) (pBSK, Stratagene, Heidelberg) besitzt das Gen für das lacZ $\alpha$ -Peptid (lacZ') und darin integriert die MCS (Abb. 3-2 und 3-3). Das  $\alpha$ -Peptid komplementiert das funktionslose lacZ $\Delta$ M15-Produkt vom *E. coli*-Stamm XL-1 Blue (Kapitel 3.4.2) zu einer funktionellen beta-Galaktosidase, die das synthetische X-Gal-Substrat in das Indoxylderivat überführt, welches an der Luft zum blauen Indigofarbstoff oxidiert. Rekombinante Plasmide bilden kein funktionelles  $\alpha$ -Peptid und sind daher als weisse Kolonien von den blauen nicht-rekombinanten Kolonien unterscheidbar. Voraussetzung ist die Benutzung von X-Gal/IPTG-Platten.

Fünf potentiell positive Klone (weisse Kolonien) wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, in 3 ml LB-Medium (+ Ampicillin) inokuliert und über Nacht bei kräftigem

Schütteln (200 rpm) und 37°C inkubiert. Eine Blau/Weiss-Selektion war im Fall vom *E. coli*-Stamm M15[pREP4] (Kapitel 3.4.2) und vom Vektorplasmid pQE-30 (Kapitel 3.3.4.2 und Abb. 3-2 und 3-3) nicht möglich, so dass hier 10 bis 20 weisse Kolonien aufgenommen und weiter mittels der PCR-Technik analysiert wurden (Kapitel 3.6.4). Dies erfolgte auch im Fall einer Blau/Weiss-Selektierung, wenn viele weisse Kolonien analysiert werden sollten.

Von der Übernachtskultur wurden dann 2 ml abgenommen, die Bakterien pelletiert [5 min, 5.000 rpm (SK 54.94/24x3g; Hettich), Medium wurde vollständig entfernt] und in 100 µl Lsg. I resuspendiert. Die Bakterien wurden dann durch Zugabe von 200 µl Lsg. II und vorsichtiges Mischen lysiert. Sofort nachdem die Bakteriensuspension klar geworden war (wenige Sekunden), wurden 150 µl der Lsg. III hinzugegeben, kräftig gemischt und das ausgefallene Netzwerk aus Bakterien-DNA und Protein/SDS-Komplex (Plasmid-DNA renaturiert, löslich) für 20 min bei 12.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäss mit 300 µl Isopropanol dekantiert, gemischt, und die ausgefallene Plasmid-DNA 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde 2x mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, und in 50 µl TE-Puffer (Kapitel 3.3.1) mit RNase A (40 µg/ml) gelöst. Für eine charakteristische Restriktionsenzymspaltung wurden 5 µl der Plasmid-DNA-Lösung eingesetzt.

#### 3.4.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen

Material:

1. LB-Medium (+ Ampicillin): Kapitel 3.4.4.1
2. LB-Medium (+ Ampicillin, + Kanamycin): LB-Medium (+ Ampicillin) + Kanamycin mit einer Endkonzentration von 25 µg/ml (Stammlsg. 25 mg/ml H<sub>2</sub>O, bei -20°C aufbewahrt)
3. QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden): beinhaltet Mini-Säulen mit DNA-Bindungsmatrix und Puffer

Vorgehensweise:

Von ausgewählten Klonen (Kapitel 3.4.4.1) wurden Übernachtskulturen in 3 ml LB-Medium (+ Antibiotika) hergestellt. Von 2 ml Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit gemäss den Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte DNA aus den einzelnen Klonen wurde von der DNA-Bindungsmatrix der Mini-Säulen in 50 µl steriles ddH<sub>2</sub>O eluiert und spektrophotometrisch quantifiziert (Kapitel 3.3.3).

### 3.4.5 Herstellung von 'Plating'-Bakterien für die Amplifikation von Phagen

#### Material:

1. *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene, Heidelberg): [ $\Delta$ (mcrA), 183,  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr), 173, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac], als Glycerinkultur bei -80°C aufbewahrt
2. LB-Medium + 10 mM MgSO<sub>4</sub>
3. 10 mM MgSO<sub>4</sub>, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt
4. 20% Maltose, steril filtriert

#### Vorgehensweise:

50 ml LB-Medium plus MgSO<sub>4</sub> (10 mM) und Maltose (0,2%) wurden mit 0,5 ml einer *E. coli* XL1-Blue MRA-Übernachtskultur angeimpft und unter kräftigem Schütteln bei 37°C (alternativ bei 30°C über Nacht) so lange inkubiert, bis eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht war. Nach einer Zentrifugation mit 4.000 rpm (JA-20, Beckman), 4°C wurde das Bakterienpellet in 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> vorsichtig resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde bei 4°C aufbewahrt und konnte bis zu 2 Wochen verwendet werden.



### 3.5 Phagen (Bakteriophagen)

#### 3.5.1 Titerbestimmung, Amplifikation und Aufbewahrung

Material:

1. Runde LB-Agar-Nährplatten mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Kapitel 3.4.1) oder quadratische (grosse) LB-Agar-Nährplatten (120/17 mm, Greiner, Solingen) mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> (ca. 50 ml Agar pro Platte)
2. Sinsheimer Medium (SM): 0,1 M NaCl (Sigma, Deisenhofen), 8 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma, Deisenhofen), 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,01% Gelatine (Fluka, Deisenhofen)
3. Chloroform (Roth, Karlsruhe)
4. LB-Top-Agarose: LB-Medium (Kapitel 3.4.1) + 0,6-0,7% Agarose (Elektrophoresis Grade, ICN Biomedicals, Eschwege) + 10 mM MgSO<sub>4</sub>, autoklaviert und bei RT aufbewahrt
5. Plating-Bakterien: Kapitel 3.4.5

Vorgehensweise:

Zur Bestimmung des Titers einer Phagenlösung werden Aliquots ( $\leq 100 \mu\text{l}$ ) einer 10er Verdünnungsreihe in SM mit 100  $\mu\text{l}$  Plating-Bakterien gemischt (400  $\mu\text{l}$  bei grossen Platten), nach 20 min Adsorption bei 37°C (Wasserbad, ohne Schütteln) mit 3 bzw. 8 ml Top-Agarose (48°C) gemischt, auf eine trockene, bei 37°C vorgewärmte LB-Agar-Nährplatte ausgegossen und gleichmässig verteilt. Nach 5 min war die Top-Agarose fest, und die Platte wurde umgedreht bei 37°C ( $\lambda$ DASH II: 8-10 h) inkubiert. Ein Phagenpartikel kann durch Infektion und Lyse der ihn umgebenden Bakterien  $10^5$ - $10^7$  Phagen produzieren, wobei in einem Bakterienrasen ein klarer Plaque entsteht. Der Phagentiter wird in pfu (plaque forming unit) angegeben.

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Plaque-Zahl} \times \text{Verdünnungsfaktor (z.B. } 10^4) \times 10^3 (\mu\text{l/ml})}{\mu\text{l Aliquot der Verdünnung}}$$

Zur Amplifikation eines Phagenklons wurden konfluente Platten (94/16 mm Platten:  $\geq 7.500$  pfu, 120/17 mm:  $\geq 30.000$  pfu) mit SM (3 bzw. 10 ml) und 100  $\mu\text{l}$  Chloroform überschichtet, und zur Diffusion der Phagen über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Phagenlösung wurde nach Abtrennung von Bakterien- und Agaroseresten [Zentrifugation 10 min mit 5.000 rpm (JA-20; Beckman)] mit Chloroform versetzt (0,3%), und in Schraubdeckelröhrchen bei 4°C aufbewahrt. Bei dieser Methode fällt der Titer pro Jahr etwa um den Faktor 10. Für eine Langzeit-Aufbewahrung ohne Titerabfall wurde die Phagenlösung aliquotiert und mit 7% DMSO (v/v) versetzt bei -70°C eingefroren.

### 3.5.2 Screening der genomischen Phagenbank von *A. viteae*

#### 3.5.2.1 Ausplattieren der genomischen Bank

Material:

1. Quadratische (grosse) LB-Agar-Nährplatten (+ MgSO<sub>4</sub>): Kapitel 3.5.1
2. Plating-Bakterien: Kapitel 3.4.5
3. LB-Top-Agarose: Kapitel 3.5.1
4. Genomische λDASH II-Phagenbank von *A. viteae*

Vorgehensweise:

Für die vorliegende Arbeit fand eine in dem Phagen-Vektor λDASH II (Stratagene, Heidelberg) unter Verwendung von partiell mit *Mbo*I gespaltener genomischer *A. viteae*-DNA hergestellte genomische Bank Verwendung (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Hirzmann, Giessen), die nach der Amplifikation im P2-lysogenen *E. coli* Stamm P2392 einen Titer von  $2,7 \times 10^9$  pfu/ml aufwies. Der Phage λDASH II ist ein sogenannter Replacement-Vektor, bei dem ein zentrales Fragment, welches u.a. die viruseigenen Rekombinationsgene *red* und *gam* enthält, durch 9-23 kb Fremd-DNA (in diesem Fall von *A. viteae*) ersetzt werden kann (hier wurde dieses zentrale Fragment mit *Bam*HI herausgespalten).

Für die Durchmusterung der genomischen Bank nach einem spezifischen Gen wurde die Anzahl von Phagen, die bezogen auf die mittlere Grösse integrierter *A. viteae*-DNA (ca. 15 kb) 10 Genomäquivalenten entsprach (Filariengenom ca.  $1,5 \times 10^8$  bp, UNNASCH & WILLIAMS, 2000), auf grosse LB-Agar-Nährplatten (+MgSO<sub>4</sub>) in einer Dichte von 25.000 Phagen/Platte ausplattiert (Kapitel 3.5.1). Dies entsprach bei dieser genomischen Bank ca. 100.000 Phagen bzw. 4 Platten. Nach Inkubation über etwa 8 h wurden die Phagenplatten auf 4°C abgekühlt (dies verhindert, dass der Plaquerasen beim DNA-Transfer mit abgehoben wird).

#### 3.5.2.2 Transfer der Plaques auf eine Nylonmembran

Material:

1. Schwarze Tinte (Pelikan, Hannover), 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt
2. Biodyne® A Nylon-Membran (Pall GmbH Filtrationstechnik, Dreieich), geschnitten in 10 x 10 cm grosse Stücke
3. Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
4. Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
5. SSC (20x): 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat, pH 7,0 (mit 1 M HCl eingestellt), autoklaviert und bei RT aufbewahrt

6. 3 mm Filterpapier (Whatmann, Maidstone)

Vorgehensweise:

Zur späteren Identifizierung positiver Plaques wurden mit einer zuvor in schwarze Tinte getauchten, aufgebogenen Büroklammer vier Löcher asymmetrisch in den Plaquerasen gestochen. Dann wurde eine 10 x 10 cm grosse, beschriftete Nylonmembran luftblasenfrei aufgelegt, wobei sich die Tintenmarkierungen auf die Membran übertragen. Nach 1 min wurde die Membran mit einer Pinzette von einer Seite her abgehoben und mit der Plaquesseite nach oben auf einem mit Denaturierungslösung getränkten 3 mm dicken Whatmann-Filter 1 min inkubiert, dann 1 min auf einen mit Neutralisierungslösung getränkten Whatmann-Filter und schliesslich für zweimal 5 min in 2x SSC gelegt. Von jeder Phagenplatte wurde zusätzlich ein zweites Membranreplikat hergestellt (Inkubation 2 min), um später falsch positive Signale ausschliessen zu können. Anschliessend wurden alle Membranen zum Trocknen auf ein Filterpapier gelegt. Die getrockneten Membranen wurden dann zwischen 2 Filterpapiere in Alufolie eingepackt zur Fixierung der DNA auf die Nylonmembran 1 h bei 80°C gebacken.

### 3.5.2.3 Hybridisierung

Material:

1. SSC (20x): Kapitel 3.5.2.2
2. Heringsperma-DNA: 1 g Heringsperma Na-Salz (Boeringer Mannheim, Mannheim) in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst, auf 0,1 M NaCl eingestellt, 1x Phenol-, 1x Phenol/Chloroform-Extraktion (Kapitel 3.3.1); die Lösung wurde 12x durch eine 17 gauge-Nadel passiert (scheren), ohne Salz mit 2 Volumen Ethanol gefällt (Kapitel 3.3.3), auf 10 mg/ml eingestellt und hitzedenaturiert (10 min im Wasserbad gekocht), sofort in Flüssig-Stickstoff abgekühlt und dann bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.
3. Denhardts (100x): 2x SSC, 2% (w/v) BSA (Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe), 2% (w/v) Ficoll (Typ 400, Sigma, Deisenhofen), 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (Serva, Heidelberg)
4. Hybridisierungslösung: 5x SSC, 50 mM Na-Phosphat, pH 6,5, 0,1% SDS, 5x Denhardts, 200 µg/ml denaturierte gescherte Heringsperma-DNA
5. DIG (Digoxigenin-markierte)-DNA-Sonden: für die Herstellung vgl. Kapitel 3.3.10 und 3.6.3
6. Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat, Fab Fragmente (Boehringer Mannheim, Mannheim)
7. Färbelösung zum Immunnachweis: 200 µl Stammlösung NBT/BCIP (Roche, Mannheim) zu 10 ml Nachweispuffer (0,05 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-Puffer, pH 9,5, autoklaviert und bei RT aufbewahrt)
8. 2 Waschpuffer: I: 2x SSC, 0,1% SDS; II: 0,2x SSC, 0,1% SDS
9. Maleinsäure-Puffer: 100 mM Maleinsäure (Sigma, Deisenhofen), 150 mM NaCl, pH 7,5 (mit NaOH eingestellt), autoklaviert und bei RT aufbewahrt

10. Caseinlösung: 10% Blocking-Reagenz (aus dem Kit: ‚Dig DNA Labeling and Detection Kit‘ von Boehringer Mannheim, Mannheim) in Maleinsäure-Puffer
11. Waschlösung: Maleinsäure-Puffer mit 0,3% Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan 20, Sigma, Deisenhofen)

#### Vorgehensweise:

Die Hybridisierung wurde in einem Hybridisierungssofen (Bachofer) oder eingeschweisst in Plastikfolie (Polystar PE-Schlauchfolie, Rische & Herfurth, Hamburg) in einem Schüttel-Wasserbad durchgeführt. Die Membranen mit der darauf fixierten DNA wurden kurz in 2x SSC angefeuchtet und zur Absättigung freier Bindungsstellen (Vorhybridisierung) 30 min bei 50°C in 40 ml Hybridisierungslösung pro Hybridisierungsröhre inkubiert (in eine Hybridisierungsröhre passen zwei 10 x 10 cm Membranen; ein Überlappen der Membranen sollte vermieden werden, da es zu hohem Hintergrund führen kann). Die Hybridisierung erfolgte dann in 5 ml frischer Hybridisierungslösung mit der hitzedenaturierten DIG-DNA-Sonde (ca. 15 ng markierte DNA pro ml Hybridisierungslösung; 10 min gekocht im Wasserbad, dann sofort in Flüssig-Stickstoff 10 min abgekühlt und anschliessend auf Eis bis zur Verwendung aufbewahrt) über Nacht bei 50°C. Danach wurde die unspezifisch gebundene DNA durch mehrere Waschschrte entfernt: 1.) zweimal 15 min im Waschpuffer I bei RT in einer Plastikschaale unter leichtem Schwenken; 2.) einmal 15 min mit auf 42°C vorgewärmtem Waschpuffer II und 3.) zweimal 10 min mit auf 60°C vorgewärmtem Waschpuffer II in einer geschlossenen Plastikschaale im 60°C Schüttel-Wasserbad. Anschliessend wurden die Membranen kurz in Maleinsäure-Puffer äquilibriert, dann 30 min in 1:10 verdünnter Caseinlösung (in Maleinsäure-Puffer, 20 ml pro Röhre) blockiert und anschliessend 60 min in verdünnter Antikörper-Konjugat-Lösung (Anti-DIG-AP Fab Fragments 1:10.000 in 1:10 verdünnter Caseinlösung, 3 ml pro Röhre) inkubiert. Ungebundenes Antikörper-Konjugat wurde durch Schwenken (zweimal 10 min) in Waschlösung entfernt. Danach wurden die Membranen in Nachweispuffer kurz äquilibriert. Zum Reaktionsnachweis wurden je zwei Membranen mit der Rückseite zueinander in 3 ml Färbelösung eingeschweisst und im Dunkeln bis zur gewünschten Intensität ohne Bewegung inkubiert (i.d.R. über Nacht) Die Reaktion wurde mit TE-Puffer (Kapitel 3.3.1) gestoppt.

#### 3.5.2.4 Isolierung der positiven Klone

##### Material:

1. Sinsheimer Medium (SM): Kapitel 3.5.1
2. Chloroform (Roth, Karlsruhe)

Vorgehensweise:

Die Umrisse der Membranen und ihre Tintenmarkierungen wurden auf eine durchsichtige Folie übertragen und diese zur Deckung mit den korrespondierenden Phagenplatten gebracht. Die positiven Plaques (auf beiden Replikamembranen identische Signale) wurden mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette (ca. 0,5 x 0,5 cm) ausgestochen und das Agarstückchen in 1 ml SM plus Chloroform (0,3%) resuspendiert. Die Phagen dieser Lösungen wurden anschliessend dreimal gescreent bis ein positives Signal einem isolierten Plaque zugeordnet werden konnte, welcher dann mit dem dünnen Vorderende einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen wurde. Zur Charakterisierung der positiven Phagen wurde entweder direkt eine ‚Long Range‘-PCR gefahren (5 µl der Phagenlösung, ein spezifischer Primer und ein T3 bzw. T7-Vektor-Primer, Kapitel 3.6.5) oder erst nach einer Amplifikation mit nachfolgender DNA-Isolierung (Kapitel 3.5.3). Zur weiteren Charakterisierung dienten Sequenzierungen der PCR-Produkte (3.3.6) bzw. Spaltungen der Phagen-DNA mit Restriktionsendonukleasen mit nachfolgender Southern Blot-Analyse (3.3.4 und 3.3.9).

3.5.3 Isolierung von Phagen-DNA nach Flüssig-Lyse

(modifiziert nach AUSUBEL et al., 1990)

Material:

1. Plating-Bakterien: Kapitel 3.4.5
2. LB-Medium (Kapitel 3.4.1) + 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 10 mM CaCl<sub>2</sub>
3. Chloroform: (Roth, Karlsruhe)
4. Chloroform/Isoamylalkohol (49:1): Kapitel 3.3.1
5. Phenol/Chloroform: Kapitel 3.3.1
6. λ-Diluent-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgSO<sub>4</sub>
7. EDTA (Sigma, Deisenhofen), 0,5 M, pH 8,0
8. DNase I (Merck, Darmstadt)
9. RNase A (Boehringer Mannheim, Mannheim)
10. Proteinase K (Merck, Darmstadt): als 10 mg/ml-Stammlösung in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) hergestellt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt
11. 10% SDS (Serva, Heidelberg): als 10%ige Lösung in ddH<sub>2</sub>O hergestellt, autoklaviert und bei RT aufbewahrt
12. Natriumacetat, 3 M, pH 5,2
13. Isopropanol (Merck, Darmstadt)
14. Ethanol, 70% (Merck, Darmstadt)
15. TE-Puffer: Kapitel 3.3.1

## Vorgehensweise:

0,1 ml einer Phagenlösung ( $10^5$ - $10^8$  Phagen/ml) wurden mit 0,1 ml Plating-Bakterien und 0,1 ml 10 mM  $MgCl_2$ /10 mM  $CaCl_2$ -Lösung 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Diese Suspension wurde dann zu 50 ml LB-Medium (+ 10 mM  $MgSO_4$ , + 10 mM  $CaCl_2$ ) in einem 250 oder 500 ml Gefäss pipettiert und so lange bei 37°C und 200 rpm kräftig geschüttelt bis eine Lyse eintrat. Eine Lyse kann man an dem sich bildenden Zelldebris am Boden des Gefässes erkennen. Ab 6 h wurde regelmässig kontrolliert und nach ersten Lyse-Anzeichen wurden die Phagen geerntet, um eine Adsorption an den Zelldebris zu verhindern. Nach Zugabe von wenigen Tropfen Chloroform wurde die Suspension unter Zurücklassung des Chloroforms in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 10 min bei 10.000 rpm (JA-20; Beckman) und 4°C zentrifugiert, um die Bakterienreste zu pelletieren. Mit dieser Methode wurden Erträge von  $5 \times 10^9$  bis  $3 \times 10^{10}$  Phagen/ml erzielt. Der die Phagen enthaltende Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert [37.000 rpm (SW 41 Ti; Beckman), 1 h, 4°C]. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen wurden 5 min über Kopf stehen gelassen, um Mediumreste zu entfernen. Die Phagen-Pellets wurden in 200 µl  $\lambda$ -Diluent-Puffer suspendiert. Pro Pellet erfolgte die Zugabe von 20 µl DNase und 30 µl RNase zum Abbau bakterieller DNA und RNA mit anschliessender Inkubation für 30 min bei 37°C im Wasserbad. Zum Aufbrechen der Phagen wurden pro Pellet bzw. 200 µl 8 µl 0,5 M EDTA (Inhibition der DNase bzw. RNase), 10 µl 10% SDS und 20 µl Proteinase K (Aufschluss des Phagenkapsids und Freisetzung der Phagen-DNA) zupipettiert, wobei nach jeder Zugabe gemischt wurde. Nach anschliessender Inkubation bei 37°C für 1 h im Wasserbad wurden zwei Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt, um die Proteine aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurde ein Volumen Phenol/Chloroform zu der Lösung gegeben, 1 min gevortext und 5 min mit 14.000 rpm (SK 54.94/24x3g; Hettich) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde aufbewahrt. Um Phenolreste zu entfernen wurde danach der gleiche Vorgang mit einem Volumen Chloroform/IAA durchgeführt. Der Überstand der Chloroform/IAA-Extraktion wurde in ein neues Gefäss gegeben; durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und einem Volumen Isopropanol wurde die Phagen-DNA gefällt und bei 14.000 rpm, 4°C, 30 min pelletiert. Bei wenig DNA wurde über Nacht bei -20°C inkubiert und am nächsten Tag zentrifugiert. Anschliessend wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol (300 µl) gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Der Ethanol wurde vollständig abpipettiert und zur Entfernung des restlichen Ethanols wurde das Pellet 5 min im Wärmeschrank (37°C) getrocknet. Die DNA wurde je nach Menge in bis zu 100 µl TE-Puffer gelöst, ihre Konzentration spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt

(Kapitel 3.3.3) und qualitativ mittels Gelelektrophorese (0,7% TAE-Gel, 120 V, 40 min, 3.3.7) beurteilt. Falls noch RNA vorhanden war (erkennbar als Schmier im unteren Bereich des Gels) wurde eine weitere RNase-Behandlung mit anschliessender Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

### 3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(nach MULLIS et al., 1986; SAIKI et al., 1985 und 1988)

#### 3.6.1 Standard-PCR und kritische Parameter

Material:

1. Taq-DNA-Polymerase (1 U/ $\mu$ l, MBI Fermentas, Leon Roth)
2. 10x Taq-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25°C, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40) und 25 mM MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas)
3. 10 mM dNTP-Mix :dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI Fermentas)
4. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

Vorgehensweise:

Bei der Standard-PCR wird ein Doppelstrang-DNA-Fragment mittels zweier flankierender Oligonukleotide durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in wiederholten Zyklen von Hitzedenaturierung, Oligonukleotid-Hybridisierung („Annealing“) und Primerverlängerung exponentiell (2<sup>n</sup>) amplifiziert (mehr als 10<sup>6</sup> Kopien aus nur wenigen Molekülen Ziel-DNA). Die Durchführung erfolgte in einem Thermoblock mit schneller Heiz-Kühl-Funktion (PCR-Maschine) (vgl. Tab. 3-2). Alle PCRs im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem ‚Single-Block-Thermo-Cycler‘ mit heizbarem Deckel (PTC-100<sup>TM</sup>, Programmable Thermal Controller, MJ Research) durchgeführt.

**Tabelle 3-2: Beispiel für eine Standard-PCR**

PCR-Maschine $\Rightarrow$	Denaturierung	3 min	94°C
	35 Zyklen	1 min Denaturierung	94°C
		1 min Hybridisierung	Primer-T <sub>m</sub> – 5°C
		2 min Elongation	72°C
	zusätzlich	5 min	72°C

Zur Vervollständigung aller Polymerisationen wurde an den letzten Zyklus ein zusätzlicher Verlängerungsschritt angehängt. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen (Puffer, Zyklen) sind von der verwendeten DNA-Polymerase, der Kombination von Oligonukleotiden und der zu amplifizierenden Sequenz abhängig. Sie sind kritische Parameter für den Erfolg und bei der Optimierung einer Amplifikation. Als Beispiel wird eine Amplifikation genomischer DNA mit 100% komplementären Oligonukleotiden durch Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) aufgeführt.



**Reaktion (50 µl):** 100 ng genomische DNA (1 bis 5 µl), 5 µl 10x Taq-Puffer, 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM Endkonzentration), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (jeweils 0,2 mM Endkonz.), 15 pmol Oligonukleotid-1, 15 pmol Oligonukleotid-2, mit sterilem ddH<sub>2</sub>O ad 49 µl, 1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl). Wenn man viele Reaktionen parallel durchführt, empfiehlt sich ein Master-Mix von Wasser, 10x Puffer, dNTPs, Primer und Taq in einem Gefäß, der aliquotiert und dann MgCl<sub>2</sub> und Matrizen-DNA zugegeben wird. Alle Pipettievorgänge sollten auf Eis durchgeführt werden. Die Taq-Polymerase kann ggf. nach der Denaturierung zugegeben werden (reduziert unspezifische Amplifikation, 'hot start'). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für PCR-Reaktionen neben der Taq-Polymerase von MBI Fermentas die peqGOLD Taq-DNA-Polymerase von Peqlab (Erlangen) mit 10x Reaktionspuffern für hohe Erträge bzw. hohe Spezifitäten verwendet.

Die amplifizierten Fragmente wurden ggf. vor Einsatz in Sequenzierungen, Restriktionsenzymspaltungen oder als Matrize in anderen PCRs nach Angaben des Herstellers mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Nukleotiden und Salzen gereinigt und anschliessend mit 30 µl ster. ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.6.2 Klonierung von PCR-Fragmenten

Vorgehensweise:

Für die PCR wurden Anker-Oligonukleotide synthetisiert, die zusätzlich zur spezifischen Sequenz am 5'-Ende eine oder mehrere Restriktionsschnittstellen besaßen, sowie eine flankierende Schutzsequenz von meist drei Nukleotiden (Tab. 3-1).

### 3.6.3 Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden mittels der PCR-Technik

Material:

1. 10x DIG-dNTP-, Mix': 1 mM dATP/dCTP/dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP, pH 6,5 aus dem 'DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive' (Boehringer Mannheim, Mannheim)
2. 10x Taq-Puffer, Taq-DNA-Polymerase (Kapitel 3.6.1)
3. Oligonukleotid-1: Av3-3 (Tab. 3-1), 30 pmol/µl
4. Oligonukleotid-2: Av3-4 (Tab. 3-1), 30 pmol/µl
5. genomische Av-DNA (Kapitel 3.3.1)

Vorgehensweise:

Als Beispiel (vgl. Tab. 3-3) wird die Herstellung einer 472 bp lange DIG-DNA-Sonde aus dem Gen *Av-shp3a* dargestellt, die für Screenings der genomischen Bank von *A. viteae* und für die Southern Blot-Analyse genomischer Av-DNA hinsichtlich des *Av-shp3a*-Gens

verwendet wurde (Kapitel 4.1). **Reaktion (100 µl):** 1 µl Av-DNA (200 ng/µl), 1 µl Oligo-1 (Av3-3, 30 pmol/µl), 1 µl Oligo-2 (Av3-4, 30 pmol/µl), 10 µl 10x Taq-Puffer, 6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µl 10x DIG-dNTP-Mix, 2 µl Taq-Polymerase (1 U/µl) und 69 µl steriles ddH<sub>2</sub>O. Parallel dazu wurde eine Kontroll-Reaktion ohne Markierung (1 µl 10 mM dNTP-Mix) durchgeführt.

**Tabelle 3-3: Programmierung des Thermo-Cyclers für die Herstellung einer DIG-DNA-Sonde aus dem Gen *Av-shp3a***

Thermo-Cycler ⇒	Denaturierung	2 min	94°C
	35 Zyklen	45 s	94°C
		1 min	56°C
		1 min	72°C
	zusätzlich	5 min	72°C

Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese (1%iges Gel in TAE-Puffer, 120 V, 45 min, Kapitel 3.3.7) überprüft.

### 3.6.4 PCR-Analyse von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden

Material:

1. LB-Medium [+ Ampicillin, + Kanamycin (nur bei *E. coli* M15, Kapitel 3.4.2)]: LB-Medium (+ Ampicillin, Kapitel 3.4.4.1) + Kanamycin mit einer Endkonzentration von 25 µg/ml (Stammlsg. 25 mg/ml H<sub>2</sub>O, aufbewahrt bei -20°C)
2. Handelsübliche Zahnstocher, autoklaviert
3. 96 Loch-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden)
4. 10x dNTP-Mix, 10x Taq-Puffer, Taq-DNA-Polymerase (Kapitel 3.6.1)
5. Oligonukleotid-1: pQE-forward (Tab. 3-1), 15 pmol/µl
6. Oligonukleotid-2: pQE-reverse (Tab. 3-1), 15 pmol/µl
7. Mineralöl (Sigma, Deisenhofen)

Vorgehensweise:

Diese Technik wird am Beispiel des Plasmid-Vektors pQE-30 (Kapitel 3.4.4.1 und 3.3.4.2) dargestellt. Von ausplattierten Bakterien, transformiert mit rekombinanten pQE-30-Plasmiden (Kapitel 3.4.4.1), wurden 10-20 Kolonien mit sterilen Zahnstochern aufgenommen, jeweils auf 50 µl LB-Medium (+ Ampicillin, + ggf. Kanamycin) in einer 96 Loch-Mikrotiterplatte überimpft und bei 37°C 2-3 h geschüttelt (160 rpm). Es wurde ein Master-Mix für 40 Reaktionen mit jeweils 10 µl hergestellt. Aliquots von 10 µl wurden in 40 0,2 ml PCR-

Gefässe pipettiert. Mit sterilen Zahnstochern wurden wenige transformierte Bakterien von den Mikrokulturen in den PCR-Mix überführt. Jeder Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und danach die PCR initiiert (vgl. Tab. 3-4)

**Tabelle 3-4: PCR-Programm zur Amplifikation eines Plasmid-Inserts. Die Elongationszeit richtete sich nach der Grösse der Inserts: pro kB eine Minute**

Thermo-Cycler ⇒	Denaturierung	2 min	94°C
	35 Zyklen	1 min	94°C
		1 min	50°C
		X min	72°C
	zusätzlich	5 min	72°C

Von jedem Ansatz wurden 5 µl auf ein 0,7% oder 1 % Agarose-Gel (abhängig von der Grösse der Insert-DNA) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet (Kapitel 3.3.7).

### 3.6.5 „Long Range“-PCR

Material:

1. „Herculase™ Enhanced“ DNA Polymerase (5 U/µl) und 10x Herculase™ Reaktionspuffer (Stratagene, Heidelberg)
2. 10 mM dNTP-Mix :dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI Fermentas, Leon Roth)

Vorgehensweise :

Die „Herculase™ Enhanced“ DNA Polymerase ist eine Mischung aus Pfu DNA Polymerase und einer geringen Menge Taq 2000™ DNA Polymerase mit einem PfuTurbo® PCR „Enhancing Factor“. In der vorliegenden Arbeit wurden für „Long Range“-PCRs mit vergleichbaren Erfolgen auch das SAWADY „Long Range PCR“-System von Peqlab (Erlangen) sowie das ProofSprinter™ DNA Polymerase „Mixture“-System von Hybaid (Heidelberg), jeweils nach Angaben der Hersteller verwendet.

Mit dem folgenden Protokoll (vgl. Tab. 3-5) wurden problemlos Fragmente von bis zu 15 kb amplifiziert. **Reaktionsbedingungen (50 µl):** 1 µl DNA-Matrize (ca. 200 ng genomische DNA bzw. ca. 50 ng λ-DNA), 5 µl 10x Herculase™ Reaktionspuffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl Oligonukleotid-1 (15 pmol/µl), 1 µl Oligonukleotid-2 (15 pmol/µl), 0,5 µl „Herculase™ Enhanced“ DNA Polymerase (5 U/µl) und 40,5 µl ster. ddH<sub>2</sub>O.

**Tabelle 3-5: Programmierung des Thermo-Cyclers für eine ‚Long Range‘-PCR**

Thermo-Cycler ⇒	Denaturierung	2 min	94°C
	10 Zyklen	15 s	92°C
		30 s	Primer-T <sub>m</sub> – 5°C
		15 min	68°C
	20 Zyklen	15 s	92°C
		30 s	Primer-T <sub>m</sub> – 5°C
		15 min + 10 s	68°C
	zusätzlich	10 min	68°C

Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese (0,7%iges Gel in TAE-Puffer, 120 V, 45 min, Kapitel 3.3.7) überprüft.

### 3.6.6 RT-PCR

Material:

1. M-MLV-H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (SuperScript™, RNase H<sup>-</sup>, 200 U/μl), 5x H-RT-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) und 100 mM DTT, alle drei von Gibco BRL, Eggenstein
2. Oligo(dT)<sub>24</sub>dVdN (20 pmol/μl) und Oligo(dN)<sub>9</sub> (50 pmol/μl) (Tab. 3-1)
3. 10 mM dNTP-Mix, Kapitel 3.6.1
4. Material 1., 2., und 3. aus Kapitel 3.6.1

Vorgehensweise:

Für die cDNA-Synthese wurde eine klonierte M-MLV-Reverse Transkriptase mit reduzierter RNaseH-Aktivität verwendet. Die Vollängen-cDNA-Synthese erfolgte mit einem Oligo(dT)<sub>24</sub>dVdN-Gemisch. **Reaktion (30 μl):** 17,5 μl Gesamt-RNA (Kapitel 3.3.2), 0,5 μl dT<sub>24</sub>VN (20 pmol/μl) und 0,5 μl dN<sub>9</sub> (50 pmol/μl) wurden 10 min bei 70°C denaturiert, für 10 min auf Eis gestellt und anschliessend nach Zugabe von 6 μl 5x RT-Puffer, 1,5 μl 10 mM dNTP-Mix und 3 μl 100 mM DTT 2 min bei 40°C äquilibriert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase gestartet, und für 1 h bei 40°C inkubiert. Nach der reversen Transkription wurde die Reverse Transkriptase 10 min bei 90°C inaktiviert und ein Aliquot für die PCR eingesetzt (Kapitel 3.6.1).

### 3.7 Expression der rekombinanten 6xHis-Proteine Av-Shp3a-1p und Av-Shp3a-12p (modifiziert nach QIAexpressionist<sup>TM</sup>, Qiagen)

#### 3.7.1 Klonierung in den Expressionsvektor pQE-30

Vorgehensweise:

1) Klonierung von Av-Shp3a-1p: Mit den spezifischen Primern Av3-3 und Av3-exp a (vgl. Tab. 3-1) wurde ein Abschnitt der Kodierregion (AS 56-AS 133, Abb. 4-18) des Gens *Av-shp3a* (als Matrize diente *Av-shp3a*-cDNA) durch PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde nach Reinigung (Kapitel 3.6.1), Restriktionsspaltung mit den Endonukleasen *Pst*I und *Nsi*I (Kapitel 3.3.4 und 3.6.2) und anschliessender Gel-Isolierung (Kapitel 3.3.8) in einen mit *Pst*I geschnittenen und dephosphorylierten Plasmid-Expressionsvektor pQE-30 (Kapitel 3.3.4.2) kloniert.

2) Klonierung von Av-Shp3a-12p: In diesem Fall wurde mit den spezifischen Primern Av3-exp s und Av3-exp a (vgl. Tab. 3-1) ein Abschnitt aus der *Av-shp3a*-cDNA amplifiziert, der für die AS 109-133 kodiert (Abb. 4-18). Nach der Restriktionsspaltung mit *Bam*HI und *Nsi*I erfolgte die Klonierung in einen mit *Bam*HI und *Pst*I geschnittenen pQE-30-Expressionsvektor.

Mit den Ligationsansätzen wurden kompetente Zellen des *E. coli* Stammes M15[pREP4] transformiert (Kapitel 3.4.3) und positive Klone durch PCR identifiziert (Kapitel 3.6.4). Bei Av-Shp3a-1p war eine PCR mit einem spezifischen Primer notwendig, um die Orientierung der ‚Inserts‘ zu bestimmen (ungerichtete Klonierung). Von den positiven Klonen wurden 1,5 ml Übernachtskulturen hergestellt.

#### 3.7.2 Überprüfung der Expression rekombinanter Klone im Mikromassstab

Material:

1. 1,5 ml Übernachtskulturen, Kapitel 3.7.1
2. LB-Medium (+ Ampicillin, + Kanamycin): Kapitel 3.4.4.2
3. 1 M Stammlösung IPTG (Roth, Karlsruhe), bei -20°C aufbewahrt
4. Lyse-Puffer B: 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0

Vorgehensweise:

Jeweils 10 ml vorgewärmtes LB-Medium (+ Ampicillin, + Kanamycin) wurden in einem autoklavierten 15 ml-Glasröhrchen mit 500 µl der Übernachtskulturen rekombinanter Expressionsklone angeimpft und so lange bei 37°C geschüttelt, bis ein OD<sub>600</sub>-Wert von 0,5-0,7 erreicht war. 2 ml jeder Kultur wurden in ein extra Röhrchen überführt und als

Expressionskontrolle weiter inkubiert. Bei den verbleibenden 8 ml wurde die Expression durch Zugabe von 8,5 µl IPTG-Stammlösung induziert (Endkonzentration 1 mM IPTG). Nach 1, 2 und 3 h wurden aus jedem Röhrchen 2 ml entnommen und 1 min mit 15.000 x g zentrifugiert. Die nicht induzierte Expressionskontrolle wurde nach 3 h entnommen. Die Bakterienpellets wurden in 40 µl Lyse-Puffer B resuspendiert, nach Zugabe von 10 µl 5x reduzierendem Probenpuffer 5 min im Wasserbad gekocht und in jeweils 15 µl-Proben auf ein 20% SDS-PAGE-Gel nach OKAJIMA et al. (1993) aufgetragen (Kapitel 3.8.3). Nach Elektrophorese, Coomassie-Färbung und Trocknung der Gele wurden die Proteinbanden von nicht induzierten und induzierten Bakterien verglichen. Anschliessend wurden 2 Bakterienklone ausgewählt, die jeweils ein Protein erwarteter Grösse synthetisierten. Aus diesen zwei Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 3.4.4.2), und das Insert ansequenziert [jeweils mit einem Sense- und einem Antisense-Primer (pQE-forward und pQE-reverse, Kapitel 3.3.4.2 und 3.3.6)], um Sequenz und Leseraster zu überprüfen.

### 3.7.3 Isolierung von Av-Shp3a-1p und Av-Shp3a-12p über Ni-NTA-Agarose-Säulen

Material:

1. LB-Medium (+ Ampicillin, + Kanamycin): Kapitel 3.4.4.2
2. 1 M Stammlösung IPTG (Roth, Karlsruhe), bei -20°C aufbewahrt
3. Lyse-Puffer A: 6 M GuHCl (Guanidinhydrochlorid), 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-Cl, pH 8,0
4. Waschpuffer C: 8 M CON<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Harnstoff), 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-Cl, pH 6,3
5. Elutionspuffer E: gleiche Zusammensetzung wie Waschpuffer C, jedoch mit HCl auf 4,5 eingestellt
6. 15 ml Chromatographie-Säule (Disposable Polypropylene Columns for gravity-flow chromatography, bed volume 5 ml, Qiagen)
7. Ni-NTA-Agarose (Qiagen)
8. 1 M Tris-HCl, pH 9,0

Vorgehensweise:

Nach Übernachtskultur der ausgewählten Bakterienklone (Kapitel 3.7.2) wurden jeweils 600 ml LB-Medium (+ Ampicillin, + Kanamycin) mit 12 ml der Übernachtskulturen angeimpft (1:50) und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis ein OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Nach Zugabe von IPTG induziert (1 mM Endkonzentration), wurden die Kulturen für weitere 4 h inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (Zentrifugation mit 4.000 x g, 20 min, 4°C), 5 min in Flüssig-Stickstoff schockgefroren und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Bakterienpellets auf Eis aufgetaut und erneut 5 min bei -70°C schockgefroren. Dies wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Auftauen für 15 min auf Eis wurden die Pellets zur Zell-Lyse in Lyse-Puffer A resuspendiert (5 ml pro g Bakterienmasse), 60 min bei

RT unter leichtem Schwenken inkubiert und einer Ultraschallbehandlung unterzogen (5 Zyklen à 10 s, 20 kHz mit 30 s-Intervallen auf Eis; Sonifier B-12, Danburg, Connecticut). Anschliessend erfolgte eine Zentrifugation der Bakterienlysate mit 10.000 x g für 30 min bei RT, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt.

5 ml 50%ige Ni-NTA-Agarose wurden kurz zentrifugiert, das Pellet in Lyse-Puffer A resuspendiert und dieser Vorgang einmal wiederholt. Danach wurde zu dem Ni-NTA-Agarosepellet der Überstand der Bakterienlysate gegeben, gemischt und zur Bindung der Proteine 30 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Gemisch aus Ni-NTA-Agarose und Lysatüberstand wurde in eine nach unten verschlossene, leere Chromatographie-Säule gefüllt. Nach Ablauf des Puffers wurde die Säule mit Lyse-Puffer gewaschen bis die Absorption bei spektrophotometrischer Messung des Durchlaufes bei einer Wellenlänge von 280 nm unter 0,01 lag. Nach jeder Zugabe von Lyse-Puffer wurde gewartet, bis die Flüssigkeit vollständig abgelaufen war. Es folgte ein Waschschrift unter gleichen Bedingungen mit Waschpuffer C. Anschliessend erfolgte die Elution der 6xHis-tag-Proteine mit jeweils 500 µl Elutionspuffer E, pH 4,5, in 1,5 ml Reaktionsgefässe (15 Fraktionen). Vor der Elution wurden in jedes der 15 1,5 ml Reaktionsgefässe 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,0 pipettiert, um den pH-Wert der eluierten Fraktionen zu neutralisieren. Jeweils 10 µl der Fraktionen 1 bis 15 wurden mit 0,25 Volumen 5x reduzierendem Probenpuffer versetzt, auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese, Coomassie-Färbung und Trocknung der Gele hinsichtlich der Reinheit der Protein-Eluate beurteilt (Kapitel 3.8.3).

Nach der Elution der 6xHis-Proteine wurden saubere Fraktionen vereinigt und in Dialysierschläuchen mit einer Ausschlussgrenze 3.500 Da dialysiert (Kapitel 3.8.2). Die Dialyse erfolgte mit langsam abnehmender Harnstoffkonzentration bei 4°C auf einem Magnetrührer. Beginnend mit 2.000 ml 7 M Lyse-Puffer B (Kapitel 3.7.2) wurden nach 2 h 500 ml des Puffers durch 500 ml 1x PBS (Kapitel 3.1.2.3) ersetzt. Danach wurde im 4-Stunden-Takt jeweils die Hälfte des Dialysepuffers gegen 1x PBS ausgetauscht, bis eine Konzentration von 10 mM Harnstoff erreicht war. Der Restharnstoff wurde durch Dialyse gegen 2 Liter 1x PBS über Nacht bei 4°C entfernt. Die Proteinmenge wurde nach SDS-PAGE der rekombinanten Proteine abgeschätzt (Kapitel 3.8.1). Mit jedem rekombinanten Protein wurden jeweils zwei geeignete Kaninchen immunisiert (Kapitel 3.1.2.3).

### **3.8 Proteinanalytische Verfahren**

#### **3.8.1 Bestimmung der Proteinmenge**

Material:

1. Protein Assay (Bio-Rad, München)
2. Bovines Serum Albumin (BSA, Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe)
3. 16-Loch-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Module, Maxisorp F16, Wiesbaden)

Vorgehensweise:

Die Bestimmung der Proteinmenge nach BRADFORD (1976) erfolgte nach Angaben des Assay-Herstellers. Die Mengen werden in  $\mu\text{g/ml}$  angegeben.

Die IgG-Konzentration (Kapitel 3.10.2.1) wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (COLIGAN et al., 1995).

Die Menge von einzelnen Proteinen (besonders dieser, die in 1x PBS unlöslich waren) wurde direkt auf einem Acrylamidgel (SDS-PAGE-Gelelektrophorese, Kapitel 3.8.3 und 3.8.4) in Anwesenheit von Protein-Markern bekannter Konzentration nach Coomassie-Färbung abgeschätzt.

#### **3.8.2 Dialyse von Proteinen**

Material:

1. Spectra/Por Dialysemembran-Set: 7 Verschlussklammern in drei verschiedenen Ausführungen, ein Dialysegefäß 1.800 ml mit Magnetstäbchen und Dialysemembranen der Breite 16 mm aus regenerierter Zellulose mit MWCO 3.500, 8.000, 15.000, 25.000 und 60.000 (Spectrum Laboratories, Roth, Karlsruhe)
2. Mikro-Dialysekapsel QuixSep mit einem Volumen von max. 0,1, 0,5 und 1,0 ml (Roth, Karlsruhe)
3. geeigneter Dialyse-Puffer (1x PBS)

Vorgehensweise:

Eine Dialyse von Proteinlösungen wurde zum Entsalzen, Puffer- oder pH-Wechsel durchgeführt. Eine Membran (Schlauch) geeigneter Porengrösse wurde ca. 30 min vor der Dialyse in 500 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  einlegt, um Glycerol zu entfernen und dann gründlich mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gespült. Der MWCO der Membran („Molecular Weight Cut Off“ oder Ausschlussgrenze in kDa) betrug die Hälfte (oder kleiner) des Molekulargewichtes der in der Membran zu verbleibenden Makromoleküle. Ein Ende des Schlauches wurde so mit der Klammer verschlossen, dass mindestens 1 cm des Schlauches über die Klammer herausragte. Die Lösung wurde eingefüllt und die Öffnung wie eben beschrieben verschlossen. Der



Dialysierschlauch wurde in einen mit Dialyse-Puffer (Volumen betrug mindestens das 100fache des Probenvolumens) gefüllten Behälter untergetaucht. Die gesamte Dialyse erfolgte bei 4°C unter langsamem Rühren des Puffers (Magnetrührer) mit Wechseln des Puffers nach 2-4 h, nach 6-8 h und nach einer Inkubation über Nacht. Zwei Stunden danach wurde die Dialyse beendet; eine Verschlussklammer wurde entfernt, der Schlauch geöffnet und die Probe mit einer Pipette entnommen.

Dialysen von geringen Volumina (bis zu 1 ml) wurden in Mikro-Dialysekapseln durchgeführt.

### 3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Material:

1. Mini-Protean-II-Elektrophorese-Einheit mit Glasplatten, Kämme, 0,75- und 1 mm-Spacer (Bio-Rad, München)
2. Lösung A (Sammelgelpuffer): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 und 0,4% SDS; bei 4°C aufbewahrt
3. Lösung B (Trenngelpuffer): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 und 0,4% SDS; bei 4°C aufbewahrt
4. Lösung C: Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe): gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1; bei 4°C aufbewahrt
5. 70% (v/v) Ethanol
6. Ammonium Persulphat (APS, Pharmacia Biotech): eine 10% Lösung (w/v) in ddH<sub>2</sub>O wurde angesetzt und in 200 µl-Aliquots bei -20°C aufbewahrt
7. TEMED (Pharmacia Biotech)
8. 1x Elektrophorese Laufpuffer: pH 8,3; 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS; bei 4°C als 10x Stammlösung aufbewahrt
9. reduzierender Probenpuffer: Roti®-Load 1, 4-fach-konz. (Roth, Karlsruhe)
10. 5x Probenpuffer (reduzierend): 5% SDS, 12,5% 2-ME (Serva, Heidelberg), 25% Glycerol und 0,005% Bromphenolblau in 156 mM Tris-HCl pH 6,8 und 5x Probenpuffer (als nicht reduzierender Puffer): ohne 2-ME
11. Molekulargewichtsmarker: M1) Protein MW Marker (Recombinant), Serva Liquid Mix (12 Banden, 20-200 kDa, 50 und 100 kDa stärkere Banden); M2) BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, 15 Banden, 10-220 kDa, 20 und 50 stärker); M3) Protein Marker, Broad Range (Biolabs, 13 Banden, 2,3-212 kDa, 66,4 und 26,6 stärker); M4) 10 kDa Protein Ladder (Gibco BRL, 13 Banden, 10-200 kDa, 50 stärker)
12. Coomassie Blue-Färbelösung: 0,125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg), 15% Methanol (absolut, Merck) und 7,5% Eisessig (98%, Merck) in ddH<sub>2</sub>O
13. Entfärbelösung für Acrylamidgele: 15% Methanol, 7,5% Eisessig in ddH<sub>2</sub>O
14. Frischhaltefolie und 1mm Whatmann-Filterpapier

Vorgehensweise:

Die SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) wurde zur Kontrolle und Charakterisierung der Protein (Parasiten-Homogenate und rekombinante Proteine)- und Immunglobulin-Präparationen eingesetzt. Desweiteren war sie eine notwendige Vorstufe für Immunoblot-Techniken zur Spezifitätskontrolle von Antisera und bei Analysen der antigenspezifischen Antikörperantwort *A. viteae* infizierter *M. coucha*.

Zum Herstellen der Gele wurden die mit 70% Ethanol gereinigten Glasplatten mit den Spacern in die Halterung eingespannt und im Giessstand justiert. Je nach gewünschter Acrylamidkonzentration des Gels wurden die entsprechenden Mengen an Lösung C, Lösung B und ddH<sub>2</sub>O (Tab. 3-6) mit 70 µl 10% APS-Lösung und 15 µl TEMED versetzt, luftblasenfrei in den Zwischenraum des Glasplatten-, 'Sandwich' gegossen und mit 70%igem Ethanol überschichtet, um eine glatte Gel-Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation (30-60 min bei RT) des Trenngels und Abgiessen des Ethanols wurde einmal mit ddH<sub>2</sub>O nachgespült, um das Anhaften des Sammelgels an das Trenngel zu gewährleisten. Das Sammelgel wurde als 3,9%ige Acrylamid-Lösung (1,25 ml Lösung A, 0,65 ml Lösung C, 3,05 ml ddH<sub>2</sub>O, 35 µl 10% APS und 15 µl TEMED) hergestellt und auf das erstarrte Trenngel gegossen. Anschliessend wurden sofort die Kämme zur Formung der Geltaschen eingesetzt.

**Tabelle 3-6: Zusammensetzung der bei der SDS-PAGE verwendeten Trenngel-Lösungen (Volumina für zwei Mini-Gele)**

Acrylamid-konzentration	Lösung C (ml)	Lösung B (ml)	ddH <sub>2</sub> O (ml)
7,5%	3,75	3,75	7,50
10%	5,00	3,75	6,25
12,5%	6,25	3,75	5,00
15%	7,50	3,75	3,75

Nach der Polymerisation des Sammelgels (30-45 min) wurden die Gele mit der Halterung in die Trennkammer eingesetzt, die Kämme vorsichtig entfernt und die Reservoirs mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit 0,34 Volumen reduzierendem Roti<sup>®</sup>-Load 4x Probenpuffer, 0,25 Volumen 5x reduzierendem oder nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt, 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und in die vorsichtig gespülten Geltaschen überführt (10-15 µl pro Geltasche). Die Elektrophorese erfolgte über 30 min bei

einer Spannung von 70 V und danach bei 120 V. Die SDS-PAGE wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hatte (nach ca. 1 h bei 120 V).

Eine Auftrennung von Peptiden und Proteinen unter 10-15 kDa ist mit dem Laemmli-Gelsystem aufgrund der ‚Ko-Migration‘ von SDS und kleineren Proteinen, welche die Auflösung stören, nicht möglich. Mit einer einfachen Modifikation des traditionellen Laemmli-Puffersystems (erhöhte Konzentrationen der Puffer), die eine bessere Trennung der Peptide und der SDS-Mizellen erlaubt, konnten Peptide bis zu 5 kDa aufgetrennt werden (OKAJIMA et al., 1993).

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel 1 h bei RT unter leichtem Schwenken in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung dauerte in der Entfärbelösung 4-5 h, wobei die Lösung mehrfach gewechselt wurde. Anschliessend wurde das Gel in ddH<sub>2</sub>O abgespült, auf ein feuchtes Whatmann-Papier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und im Vakuumtrockner bei 80°C 45 min getrocknet. Anhand der Molekulargewichtstandards wurde die Grösse der Proteinbanden bestimmt (Kapitel 3.8.4).

### 3.8.3.1 SDS-PAGE zur Auftrennung von Peptiden bis zu 1 kDa

Material:

1. 2x Tricin-Probenpuffer: 2 ml Lösung A (Kapitel 3.8.3; 0,1 M Endkonz.) + 2,4 ml (3,0 g) Glycerol (24% Endkonz.) + 0,8 g SDS (8% Endkonz.) + 0,31 g DTT (0,2 M Endkonz.) + 2 mg Coomassie Blue G-250 (0,02% Endkonz.) mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 ml
2. Acrylamidlösung: 24 g Acrylamid (PAGE, Pharmacia Biotech, 48% Endkonz.) + 0,75 g Bisacrylamid (Pharmacia Biotech, 1,5% Endkonz.) mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml
3. Gelpuffer (3,0 M Tris/HCl und 0,3% SDS): 72,68 g Tris in 120 ml H<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 8,45 mit 1 N HCl eingestellt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, 0,6 g SDS (Serva) zugegeben und bei 4°C aufbewahrt
4. Anodenpuffer: 121,1 g Tris (0,2 M Endkonz.) + 500 ml ddH<sub>2</sub>O, dann pH auf 8,9 mit konz. HCl eingestellt und auf 5 Liter mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt
5. Kathodenpuffer: 12,11 g Tris (0,1 M Endkonz.) + 17,92 g Tricin (Sigma, 0,1 M Endkonz.) + 1 g SDS (0,1% Endkonz.) mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter, der pH-Wert sollte ohne weitere Einstellung ca. 8,25 betragen
6. Molekulargewichtsmarker: Mp1) Peptidmarker eigener Zusammenstellung freundlicherweise überlassen von M. Eberle (Inst. für Biochemie, Giessen), 8 Banden, 3,5-66 kDa; Mp2) Protein Molecular Weight Standards, 2,850 – 43,000 Molecular Weight Range (Gibco BRL), Peptid-Marker mit 6 Banden, 2,850-43,000 kDa, jedes Protein ist in einer Konzentration von 1 mg/ml vorhanden
7. vgl. Material 1., 5., 6., 7., 12., 13., und 14. aus Kapitel 3.8.3
8. 40% (v/v) Glycerol (Ultra Pure, ICN) in ddH<sub>2</sub>O

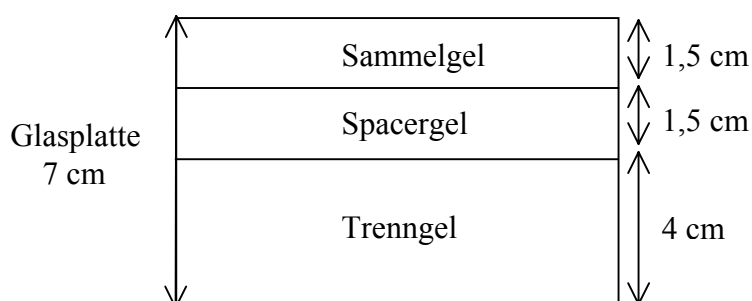
Vorgehensweise:

Dieses Gelsystem erlaubt die Trennung von Peptiden bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa (Zusammensetzung der Gele s. Tab. 3-7). Dies wird erreicht durch die Einführung eines zusätzlichen Spacergels (Abb. 3-5) und die Verwendung von Tricin statt Glycin als Leitanion (SCHAGGER & VON JAGOW, 1987).

**Tabelle 3-7: Zusammensetzung der zur Trennung von Peptiden verwendeten Gel-Lösungen**

<u>Trenngel</u> (16,5%)	<u>Spacergel</u> (15,3%)	<u>Sammelgel</u> (5%)
6 ml Acrylamidlösung	1,86 ml Acrylamidlösung	0,72 ml Acrylamidlösung
6 ml Gelpuffer	3,0 ml Gelpuffer	2,22 ml Gelpuffer
6 ml 40% (v/v) Glycerol	4,14 ml ddH <sub>2</sub> O	4,14 ml ddH <sub>2</sub> O
60 µl 10% APS	30 µl 10% APS	72 µl 10 APS
6 µl TEMED	3 µl TEMED	7,2 µl TEMED

Im Unterschied zum Laemmli-Gelsystem (Kapitel 3.8.3) wurde hier direkt nach dem Giessen der Trenngel-Lösung die Spacergel-Lösung aufgegossen (Abb. 3-5). Ethanolreste wurden mit einer Pufferlösung [2,5 ml Lösung B (Kapitel 3.7.3) + 7,5 ml ddH<sub>2</sub>O] abgespült. Es wurden getrennte Anoden- und Kathodenpuffer verwendet. Die Proben wurden 1:1 mit dem 2x Tricin-Probenpuffer vermischt und 5 min im kochenden Wasser erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte 1 h bei 30 V, sodann 1 h bei 70 V und abschliessend 1 h bei 120 V. Nach dem Lauf wurden die Gele wie im Kapitel 3.7.3 beschrieben mit Coomassie gefärbt und getrocknet.



**Abbildung 3-5: Gelaufbau zur Trennung von Peptiden in der SDS-PAGE**

### 3.8.4 Bestimmung der relativen Molekulargewichte nach SDS-PAGE

Vorgehensweise:

Um die Grösse der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine kalkulieren zu können, wurde bei jedem Lauf ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen (Kapitel 3.8.3 u. 3.8.3.1).

Mit der Hilfe der Markerbanden konnte eine Eichkurve erstellt werden. Zu diesem Zweck wurden die Migrationsfaktoren (MF) für jede Markerbande nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{MF} = \frac{\text{Laufstrecke der Moleküle}}{\text{Gesamtlaufstrecke}}$$

In einem Koordinatensystem wurden die errechneten MF-Werte auf die x-Achse und der dekadische Logarithmus der Molekulargewichte der Markermoleküle auf die y-Achse aufgetragen. Anhand dieser Werte erfolgte die Erstellung einer Eichkurve. Das Molekulargewicht des gewünschten Proteins konnte dann über seinen MF-Wert annähernd bestimmt werden.

### 3.8.5 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Material:

1. Lösung 1 (50% Methanol/10% Essigsäure): 400 ml dH<sub>2</sub>O + 100 ml Essigsäure + 500 ml Methanol
2. Lösung 2: 50% Methanol in dH<sub>2</sub>O
3. Lösung 3 (0,8 mM Natriumthiosulfat-Lösung): 0,1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (248,18 g/mol) in 500 ml dH<sub>2</sub>O gelöst und vor Gebrauch 1:1 mit dH<sub>2</sub>O versetzt
4. Lösung 4: 0,2 g Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>, 169,87 g/mol, 0,2% Endkonz.) + 75 µl 37% Formaldehyd + dH<sub>2</sub>O auf 100 ml, frisch angesetzt
5. Lösung 5: 30 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (105,99 g/mol) + 2 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (248,18 g/mol) + 0,25 ml 37% Formaldehyd + dH<sub>2</sub>O auf 500 ml, vor Gebrauch 1:3 bis 1:4 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt
6. Lösung 6: 9,3 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O (372,24 g/mol, 0,05 M EDTA Endkonz.) in 500 ml dH<sub>2</sub>O

Vorgehensweise:

Alle Arbeitsschritte wurden bei RT in einem Kunststoffbehälter (8 x 14 cm) unter leichtem Schwenken in 50 ml Lösung durchgeführt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese (Kapitel 3.8.3 und 3.8.3.1) und Abtrennung des Sammelgels 2 h mit Lösung 1 fixiert und dann mit dH<sub>2</sub>O 1 h oder über Nacht bei einmaligem Wasserwechsel gewaschen. Es folgten eine Waschung mit Lösung 3 (dreimal 10 min) und die Vorbehandlung mit Lösung 4 (2 min). Anschliessend wurde mit dH<sub>2</sub>O dreimal 20 s gewaschen und 10 min in Lösung 6 inkubiert. Dieser Schritt und alle folgenden wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach erneuter Waschung

mit dH<sub>2</sub>O zweimal 30 s erfolgte die Entwicklung mit Lösung 8 für 2-5 min. Dabei war zu beachten, dass bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität eine gewisse Nachfärbung auch nach dem Stoppen erfolgt. Dann wurde wieder mit dH<sub>2</sub>O zweimal 30 s gewaschen und die Reaktion mit Lösung 10 gestoppt (10 min). Nach anschliessender Waschung mit dH<sub>2</sub>O für 30 min wurden die Gele wie im Kapitel 3.8.3 getrocknet.

### 3.8.6 Western-Blotting (Semi-Dry-Blotting)

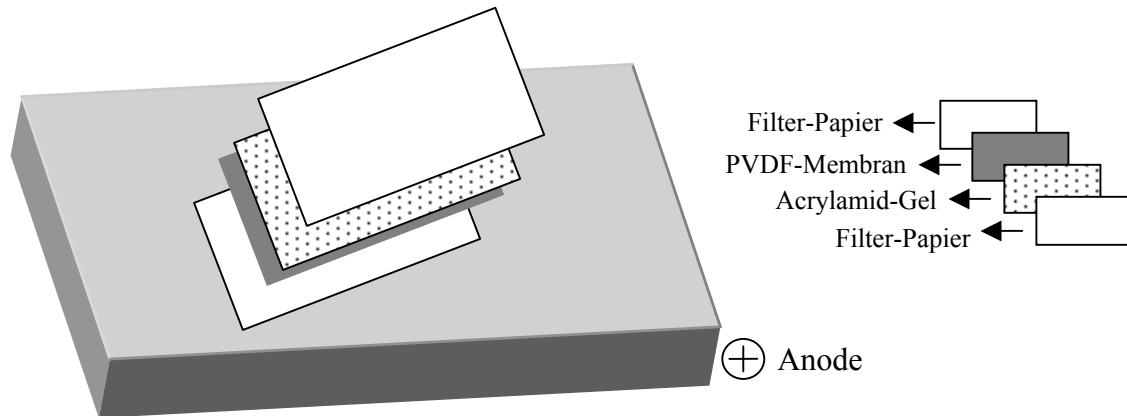
Material:

1. Immobilon™-P Transfer Membran (PVDF, Millipore, Eschborn), auf Gelgrösse zugeschnitten (bei Mini-Gelen ca. 6 x 9 cm)
2. Filter-Papier: 3 mm dickes Filterpapier (Whatmann, Maidstone), jeweils zwei pro Gel, auf Gelgrösse (ca. 6 x 9 cm) zugeschnitten
3. Transfer-Puffer: 3,03 g Tris (25 mM Endkonz.) + 14,4 g Glycin (0,192 mM Endkonz.) + 150 ml Methanol (15% Endkonz.) + ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter, pH-Wert der Lösung sollte dann ca. 8,3-8,4 betragen
4. Transfer-Puffer (+ 0,4% CHAPS): 200 ml Transfer-Puffer (vgl. Punkt 3.) + 0,8 g CHAPS (Calbiochem)
5. Methanol (Merck)

Vorgehensweise:

Western-Blotting ist ein Verfahren zum Transfer von Proteinen (hier: *A. viteae*-Antigen, rekombinante 6xHis-Proteine und *M. coucha*-IgG) auf Membranen nach der SDS-PAGE. Das Western-Blotting wurde mit einem Semi-Dry-System (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die SDS-PAGE-Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese und Abtrennen vom Sammelgel in Transfer-Puffer zusammen mit den Filterpapieren 15 min äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde vorher 10 s in Methanol gelegt. Für die Wiederherstellung der Antikörper-Bindungsfähigkeit von auf PVDF-Membran transferierten, hydrophoben (Membran)-Proteinen wurde ein Transfer-Puffer mit dem zwitterionischen Detergenz CHAPS verwendet (modifiziert nach MANDRELL & ZOLLINGER, 1984).

Ca. 3-5 ml Transfer-Puffer wurden auf die Mitte der unteren Platte pipettiert. Darauf wurden ein in Transfer-Puffer äquilibriertes Filterpapier, die Membran, das Gel und ein zweites in Transfer-Puffer äquilibriertes Filterpapier gelegt (Abb. 3-6). Evtl. vorhandene Luftblasen wurden mit einer Pipette durch Rollen entfernt. Anschliessend wurde die Kathoden-Platte auf die Kontakte gesetzt und der Transfer bei 200 mA (mindestens 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gel) Stromstärke 1 h durchgeführt. Das SDS-PAGE-Gel wurde anschliessend in Coomassie (Kapitel 3.8.3) gefärbt, um die Effizienz des Blotting-Vorganges zu überprüfen.



**Abbildung 3-6: Vorbereitung eines Semi-Dry-Transfers**

### 3.8.7 Dot-Blotting

#### Material:

1. Immobilon™-P Transfer Membran (PVDF, Millipore, Eschborn)
2. Methanol (Merck)
3. 10x TBS (Tris Buffered Saline): 60,57 g Tris (0,05 M Endkonz.) + 85 g NaCl (0,85% Endkonz.) + 800 ml ddH<sub>2</sub>O, auf pH 7,5 mit konz. HCl eingestellt und auf 1 Liter mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt; autoklaviert und bei RT aufbewahrt; vor Gebrauch für 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt
4. 1 mm Filterpapier (Whatmann)
5. 5x Probenpuffer (reduzierend): Kapitel 3.8.3, ohne Bromphenolblau (BPB)

#### Vorgehensweise:

Dot-Blotting wurde als eine schnelle und effektive Methode eingesetzt, wenn keine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen notwendig war (z.B. Lösung mit nur einem, bekannten Protein).

PVDF-Membran wurde 5 s in Methanol gelegt und anschliessend 15 min in 1x TBS äquilibriert. Die Membran wurde dann auf ein Filterpapier gelegt und getrocknet (ca. 5-10 min; bis dünne, weisse Striche auf der Membran erschienen). Danach wurden 5 µl einer Proteinlösung in 1x PBS aufgetropft und an der Luft vollständig getrocknet (15-20 min). Wenn es sich um Proteine handelte, die in 1x PBS unlöslich waren, wurde die Probe vor dem Auftropfen auf die Membran mit 0,25 Volumen 5x Probenpuffer ohne BPB versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht. Die getrockneten Membranen wurden danach sofort blockiert (Kapitel 3.9.1.1).

### 3.9 Immunnachweise

#### 3.9.1 Immunoblot-Techniken

Immunoblots wurden eingesetzt zur Überprüfung der Präimmunsera auf Kreuzreaktivität, Spezifitätskontrolle von Antisera und bei Analysen der antigenspezifischen Antikörperantwort *A. viteae*-infizierter *M. coucha*.

##### 3.9.1.1 Antikörpernachweis mit chromogenem Substrat (Immunfärbung)

Material:

1. PVDF-Membran mit transferierten Proteinen (Kapitel 3.8.6 und 3.8.7)
2. Ponceau S-Färbelösung: 0,5 g Ponceau S (Sigma; Endkonz. 0,5%) in 1 ml Essigsäure gelöst und auf 100 ml mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt
3. Coomassie Blue-Färbelösung: Kapitel 3.8.3
4. Entfärbelösung für PVDF-Membranen: 45% Methanol und 10% Essigsäure in dH<sub>2</sub>O
5. Blockierungs-, und Waschlösung (TTBS: Tween 20/TBS): 0,1% Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate, Sigma) in 1x TBS (Kapitel 3.8.7), bei 4°C aufbewahrt und innerhalb einer Woche verbraucht
6. Primäre Antikörper: 1) Präimmunsera von Kaninchen (vor der Immunisierung gewonnen) sowie affinitätsgereinigte Kaninchen-Präimmunsera und Sera nicht-infizierter *M. coucha* (vor der Infektion mit *A. viteae*-L3, Poolserum); 2) Antisera: 2.1) polyklonale Kaninchensera gegen das rekombinante 6xHis-Protein Av-Shp3a-12p und gegen *M. coucha*-IgG vor und nach Affinitätsreinigung und Sera mit *A. viteae* infizierter *M. coucha* (aus unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion, Poolsera); 2.2) monoklonaler Maus-IgA, kappa, TEPC15 (Sigma)
7. Sekundäre Antikörper (Konjugate): Kommerzielle Konjugate: Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg): mit Peroxidase markierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper von der Ziege; eigenes nach TIJSEN & KURSTAK (1984) hergestelltes Anti-*M. coucha* IgG-Konjugat, mit Peroxidase markiert (Kapitel 3.10.2); Anti-IgA-Peroxidase-Konjugat (Sigma)
8. Substratlösung (chromogenes Substrat): 1 Tablette 4-Chloro-1-Naphthol (4-CN, Sigma) in 10 ml Methanol gelöst (Stocklösung, bei 4°C im Dunkeln 2-4 Wochen verwendbar). 2 ml dieser Stocklösung + 10 ml 1xTBS + 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, unmittelbar vor Gebrauch angesetzt, 2 ml pro Membranstreifen

Vorgehensweise:

Nach dem ‚Western‘-Transfer erfolgte eine reversible Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran mit Ponceau-Färbelösung für 10 min. Danach wurde die Membran kurz gewässert (dH<sub>2</sub>O) und den Spuren des Gels entsprechend in Streifen geschnitten. Die Membranstreifen wurden einzeln in einer eigens dafür hergestellten Plastik-Kammer



(11,5x10,5x1,5 cm Plastik-Kammer mit 10 Spuren à 0,7 cm Breite) mit jeweils 3 ml ddH<sub>2</sub>O unter Schwenken zur vollständigen Entfernung des Ponceau-Farbstoffes 10 min gewaschen. Membranstreifen mit Markerbanden und ein Kontrollstreifen mit Antigen wurden in Coomassie Blue-Färbelösung inkubiert und anschliessend in der Entfärbelösung für PVDF-Membranen für 5-10 min entfärbt (2-3 Wechsel der Lösung), dann an der Luft getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei RT in der Plastik-Kammer, wobei die Blockierung und die Antikörperinkubationen auf einer Rotations-Plattform unter langsamem Drehen und die Waschschrte auf einem Taumler unter kräftigem Schütteln durchgeführt wurden. Die Protein-beschichteten Membranstreifen wurden 60 min bei RT oder bei 4°C über Nacht in jeweils 3 ml Blockierungslösung zur Sättigung unspezifischer (freier) Bindungsstellen auf der Membran inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Verdünnung des ersten Antikörpers mit Blockierungspuffer (Kaninchensera 1:1.000 bis 1:2.000, affinitätsgereinigte Kaninchensera 1:5 bis 1:100; *M. coucha*-Sera 1:10). Nach Absaugen der Blockierungslösung wurden zu jedem Streifen 2 ml der Antikörperlösung gegeben und 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 5maligem Waschen (je 10 min) in je 3 ml TTBS erfolgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG 1:3.000 in TTBS oder Anti-*M. coucha* IgG 1:10 in TTBS; je 2 ml zu jedem Streifen). In den Fällen, in denen eine Kontrolle der Konjugatspezifität beabsichtigt war, entfiel die Inkubation mit der primären Antikörper. Nach erneutem Waschen in TTBS erfolgten zwei Waschschrte (5 min und 15 min) mit je 3 ml 1x TBS. Tween 20 in TTBS beeinträchtigt die 4-CN Entwicklung (BJERRUM et al., 1988). Danach wurde die frisch angesetzte Substratlösung (je 2 ml pro Membranstreifen) zugegeben. Die Farbreaktion war nach 10 min beendet. Die Streifen wurden kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und im Dunkeln getrocknet. Als Grössenvergleich diente der Coomassie-gefärbte Membranstreifen mit dem Marker. Die Membranen wurden in Alufolie verpackt und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.9.1.2 Antikörpernachweis mit Chemilumineszenz-Substrat

Material:

1. Material 1., 2., 3. und 4. aus Kapitel 3.9.1.1
2. Blockierungslösung: 5% (w/v) fettfreies Trockenmilchpulver und 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma) in 1x TBS (Kapitel 3.8.7)
3. Waschlösung (TTBS: Tween 20/TBS): Kapitel 3.9.1.1

4. Primäre Antikörper: 1) polyklonale, affinitätsgereinigte Kaninchensera; 2) DMAE-reaktive Antikörper (SCHARES et al., 1994) (Kapitel 4.7.3)
5. Sekundärer Antikörper (Konjugat): Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg): mit Peroxidase markierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper von der Ziege
6. Chemilumineszenz-Substrat: Die Lösungen A und B (ECL Plus<sup>TM</sup> Western blotting detection reagents, Pharmacia Biotech), bei 4°C aufbewahrt, wurden ca. 30 min vor Anfertigung der Substratlösung bei RT äquilibriert und vor Anwendung 40:1 gemischt; verwendet wurden 0.1 ml/cm<sup>2</sup> Membran
7. Frischhaltefolie
8. Plastikfolie (Polystar PE-Schlauchfolie, Rische & Herfurth, Hamburg)
9. Kodak BioMax Light Film (BioMax Light-1, Sigma)

#### Vorgehensweise:

Es wurde wie im Kapitel 3.9.1.1 verfahren, aber mit folgenden Änderungen: 1. die Blockierungslösung enthielt noch zusätzlich fettfreies Trockenmilchpulver (0,5%); nach dem Blockieren wurde zweimal 2 min mit TTBS ( $> 4 \text{ ml/cm}^2$  Membran) gewaschen; 2. Antikörperverschüttungen und Waschschriffe wurden mit TTBS durchgeführt, wobei jeweils das zweite Waschen in grösserem Volumen ( $> 4 \text{ ml/cm}^2$  Membran) 15 min dauerte; 3. nach dem letzten Waschriff wurden nach vollständiger Entfernung der Waschlösung auf jeden Membranstreifen 0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran Substratlösung aufgetropft und 5 min inkubiert. Bei Arbeiten mit ganzen Membranen wurden diese mit entsprechender Menge Substratlösung für 5 min in Plastikfolie eingeschweisst. Anschliessend wurden die Membranen bzw. die Membranstreifen unter Vermeidung von Luftblasen zwischen zwei Blätter Frischhaltefolie gelegt und 10 s, 30 s und 3 min auf ‚BioMax Light‘ Film exponiert. Nach dem Auflegen des Filmes auf die Membran wurden dessen Ränder mit Farbstift markiert, damit nachher die Membran-Grenzen auf den Film übertragen werden konnten.

#### 3.9.2 Mikrofilarien-Agglutinations-Assay (MAA)

(modifiziert nach ZAHNER & WEGERHOF, 1985)

##### Material:

1. *A. viteae*-Mikrofilarien: Kapitel 3.2.2
2. RPMI 1640: Kapitel 3.2.2
3. Antikörper: affinitätsgereinigtes Kaninchen-Präimmunserum, polyklonales Kaninchenserum gegen das rekombinante 6xHis-Protein Av-Shp3a-12p nach Affinitätsreinigung, Sera von *M.*

*coucha* vor der Infektion (Poolserum), sowie Sera mit *A. viteae* infizierter *M. coucha* (ca. 140 Tage p.i., Poolserum)

Vorgehensweise:

*A. viteae*-Blutmikrofilarien wurden nach der Isolierung (Kapitel 3.2.2) dreimal mit 50 ml RPMI 1640 gewaschen (Zentrifugation 10 min, 400 x g, ohne Bremse). Anschliessend wurden je 5.000 Mikrofilarien in RPMI 1640 mit 10 µl Serum in einem Gesamtvolumen von 40 µl in 1,5 ml Eppendorf-Gefässen mindestens 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden nach kräftigem Schütteln je 5 µl entnommen, auf einen Objektträger aufgetropft und mit einem Deckglas abgedeckt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde der Prozentsatz agglutiniierter Mikrofilarien bestimmt.

### **3.10 Herstellung und Reinigung von Antikörpern und Konjugaten**

#### **3.10.1 Affinitätsreinigung von Antiseren**

Material:

1. Material von Kapiteln 3.8.3, 3.8.4 (+ präparative Kämme) und 3.8.6
2. Polyklonale Kaninchen-Antisera gegen das rekombinante 6xHis-Protein Av-Shp3a-12p und gegen *M. coucha*-IgG sowie Präimmunsera
3. 1x TBS (Kapitel 3.8.7)
4. BSA-Lösung (2%): 0,2 g BSA (Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe) in 10 ml TTBS (Kapitel 3.9.1.1)
5. 0,1 M Glycin, pH 2,3
6. 1 M Tris-HCl, pH 8,0

Vorgehensweise :

Spezifische Sera wurden durch Affinitätsreinigung von Kaninchen-Antisera bzw. Präimmunsera (als Kontrolle) an auf eine PVDF-Membran transferiertem Protein (rekombinantes 6xHis-Protein Av-Shp3a-12p und *M. coucha*-IgG) hergestellt. 50 µg Protein wurden auf ein präparatives SDS-PAGE-Gel (je zwei Gele pro Affinitätsreinigung) aufgetragen. Im Fall von Av-Shp3a-12p waren es Peptidgele (Kapitel 3.8.4) und bei *M. coucha*-IgG 7,5%ige Gele (Kapitel 3.8.3). *M. coucha*-IgG wurde in einem Probenpuffer ohne 2-ME aufgenommen. Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen mit Semi-Dry-Blotting (Kapitel 3.8.6) und anschliessender Ponceau-Färbung (Kapitel 3.9.1.1) wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und in einem 15 ml

Plastikröhrchen (Nunc) mit 10 ml 2%iger BSA-Lösung für 60 min bei RT unter leichtem Schwenken blockiert. Alle folgenden Schritte wurden in diesem Röhrchen mit 10 ml Volumen bei RT unter Schwenken durchgeführt. Nach der Blockierung wurden die Membranstreifen mit dem gebundenen Protein in 1:50 in TTBS verdünntem Antiserum über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Streifen mit TTBS viermal 5 min gewaschen. Gebundene Antikörper wurden durch Zugabe von 1 ml 0,1 M Glycin (pH 2,3) und einminütiges Schwenken eluiert. Die Lösung mit den eluierten Antikörpern wurde sofort durch Zugabe von 0,35 Volumen 1 M Tris-HCl (pH 8,0) und 0,5 ml 2%iger BSA-Lösung neutralisiert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Membranstreifen wurden zweimal 5 min mit 10 ml 1x TBS gewaschen und für spätere Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 3.10.2 Herstellung eines Anti-*M. coucha* IgG-Peroxidase-Konjugates

#### 3.10.2.1 Isolierung von IgG aus Serum von *M. coucha*

Material:

1. 10 ml *M. coucha*-Serum
2. sterile Glaswolle und Plastik-Trichter
3. Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech)
4. 1x PBS (Kapitel 3.1.2.3) mit pH 8,0 (Bindungspuffer) und pH 7,3 (Dialyse-Puffer)
5. 0,1 M Citronensäure auf pH 3,0 mit 1 M NaOH eingestellt
6. 0,2 µm Ready-To-Use Filter Holders (30 mm Diameter, Renner)
7. 15 ml Chromatographie-Säule (Disposable Polypropylene Columns for gravity-flow chromatography, bed volume 5 ml, Qiagen)
8. 1 M Tris-HCl, pH 9,0

Vorgehensweise:

500 mg Protein A-Sepharose wurden mit 4 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O versetzt, 30 min bei RT gequollen, auf die Chromatographie-Säule aufgetragen und mit 20 ml Bindungspuffer (1x PBS, pH 8,0) äquilibriert. Das *M. coucha*-Serum war sehr lipämisch und wurde zur Entfernung der Lipide durch einen Trichter, dessen Öffnung mit Glaswolle bedeckt war, gefiltert. Danach wurde die Glaswolle mit etwas Bindungspuffer gespült und vorsichtig mit Handschuhen ausgepresst. Das Serum wurde anschliessend auf 2 ml Reaktionsgefässe verteilt, 30 min bei 13.000 rpm (SK 54.94/24x3g; Hettich) und 4°C zentrifugiert, durch einen 0,2 µm-Filter steril filtriert, 1:10 mit Bindungspuffer verdünnt und auf die mit

Bindungspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Danach wurde solange mit Bindungspuffer gewaschen, bis kein Protein mehr nachweisbar war (Absorptionsmessung bei 280 nm). Gebundenes IgG wurde dann mit jeweils 500 µl 0,1 M Citronensäure, pH 3,0, von der Protein A-Sepharose-Säule eluiert (20 Fraktionen). Vor der Eluierung wurden die Reaktionsgefäße mit 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,0, versehen, um die eluierten Fraktionen zu neutralisieren.

Jeweils 10 µl der Fraktionen 1 bis 20 wurden zur Kontrolle mit 0,25 Volumen 5x nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt, auf 7,5% SDS-PAGE-Gele aufgetragen und nach Elektrophorese, Coomassie-Färbung und Trocknung der Gele auf Reinheit beurteilt (Kapitel 3.8.3). Reine IgG-Fraktionen wurden in Mikro-Dialysekapseln mit einem MWCO der Dialyse-Membran von 60 kDa gegen Dialyse-Puffer (1x PBS, pH 7,3) dialysiert (Kapitel 3.8.2). Nach Bestimmung der IgG-Konzentration (Kapitel 3.8.1), Immunisierung geeigneter Kaninchen (Kapitel 3.1.2.3) und Affinitätsreinigung der polyklonalen Kaninchen-Antisera (Kapitel 3.10.1) erfolgte die Konjugation der Antikörper mit Peroxidase.

### 3.10.2.2 Konjugation von Antikörpern mit Peroxidase (nach TIJSEN & KURSTAK, 1984)

#### Material:

1. 1 mg/ml Antikörperlösung (affinitätsgereinigte, polyklonale Antikörper von Kaninchen gegen *M. coucha* IgG)
2. ‚Horseradish‘ Peroxidase (HRPO; Sigma Type VI-A)
3. 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8: 510 ml Stock A + 490 ml Stock B + 1000 ml ddH<sub>2</sub>O gemischt.  
Stock A (0,2 M): 31,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in 1 Liter H<sub>2</sub>O; Stock B (0,2 M): 28,39 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 Liter H<sub>2</sub>O
4. 0,1 M Carbonat-Puffer, pH 9,2: 1,36 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 7,35 NaHCO<sub>3</sub> + 950 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 9,2, und auf 1 Liter mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt
5. Natrium-m-Perjodat-Lösung (NaIO<sub>4</sub>, Sigma): 0,0855 g in 50 ml ddH<sub>2</sub>O, unmittelbar vor Anwendung angesetzt
6. Natrium-Borohydrid-Lösung (NaBH<sub>4</sub>): 0,05 g + 1 µl 1 M NaOH (0,1 mM Endkonz.) + 10 ml ddH<sub>2</sub>O, unmittelbar vor Anwendung angesetzt
7. gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung: zuerst eine 0,01 M Tris-HCl-Lösung angesetzt: 1,21 g Tris mit 990 ml ddH<sub>2</sub>O versetzt und pH auf 7,0 eingestellt und auf 1 Liter mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. 767 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 1000 ml 0,01 M Tris, pH 7,0, gelöst, auf pH 7,0 eingestellt und bei 4°C aufbewahrt.
8. Bovines Serum Albumin (Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe)
9. Glycerol (Ultra Pure, ICN)

10. Dialyse-Membran (MWCO 25000) und Mikro-Dialysierkapseln (Kapitel 3.8.2)
11. 6 ml Chromatographie-Säule (Disposable Polypropylene Columns for gravity-flow chromatography, bed volume 1 ml, Qiagen)
12. chromatographisches Medium: Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech)
13. Tris/EDTA/NaCl (TEN)-Puffer, pH 7,2: 6,06 g Tris + 0,37 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  + 8,77 g NaCl + 930 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$ , auf pH 7,2 mit HCl eingestellt und auf 1 Liter mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgefüllt

#### Vorgehensweise:

1 ml Antikörper-Lösung (IgG-Konzentration  $\geq 1$  mg/ml) wurde über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gegen 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8, in Mikro-Dialysiekapseln dialysiert (Kapitel 3.8.2). Am nächsten Tag wurden 5 mg HRPO in 0,5 ml 0,1 M Carbonat-Puffer, pH 9,2, gelöst und 0,25 ml der Lösung mit 0,25 ml frisch angesetzter  $\text{NaIO}_4$ -Lösung gemischt. Die Mischung wurde in einem mit Parafilm abgedichteten Gefäß bei RT im Dunkeln 2 h inkubiert. Zur Konjugation wurden nacheinander die 0,5 ml Peroxidase- $\text{NaIO}_4$ -Lösung und 1 ml dialysierte Antikörper-Lösung in eine unten verschlossene 6 ml Chromatographie-Säule gegeben und sofort mit ungequollenem Sephadex G-25 Medium (0,3 g) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 3 h bei RT im Dunkeln. Das Konjugat wurde von der Säule mit 0,75 ml Carbonat-Puffer eluiert, mit 38  $\mu\text{l}$  frisch angesetzter  $\text{NaBH}_4$ -Lösung gemischt, 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert, nochmals mit 112  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_4$ -Lösung (neu angesetzt) versetzt und 60 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgten die Zugabe von 0,9 ml gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, eine Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  für 30 min unter leichtem Schwenken und eine Zentrifugation mit  $10.000 \times g$  (15 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 0,75 ml TEN-Puffer resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gegen 2 Liter TEN-Puffer und nach einem Wechsel des TEN-Puffers am nächsten Morgen für weitere 4 h bei  $4^\circ\text{C}$  in Mikro-Dialysierkapseln dialysiert. Nach der Dialyse wurde zur Stabilisierung der Konjugatlösung BSA in einer Endkonzentration von 20 mg BSA/ml zugegeben. Anschliessend wurde ein Volumen Glycerol hinzugefügt, das Konjugat aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.11 Immunhistologie

#### 3.11.1 Herstellung von Gewebeschnitten aus adulten *A. viteae* und Nachweis antigener Strukturen

##### 3.11.1.1 Paraffinschnitte

Material:

1. Bouin-Fixierlösung: 15 Teile gesättigte Pikrinsäure (Merck), 5 Teile Formalin (37% Formaldehyd, Merck), 1 Teil Essigsäure (Merck)
2. Alkoholreihe: 30%, 50%, 70%, 90%, 96% abs. Ethanol (Merck)
3. Methylbenzoat und Benzen (Merck)
4. Chromotrop 2R (Sigma)
5. Paraplast (Histowax, Reichert Jung, schmelzend bei 57°C)
6. Objektträger Super Frost®Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) und PAP-Pen (Stift, SCI Science Services)
7. 1x TBS (Kapitel 3.8.7)
8. Rotihistol® (Roth)
9. Blockierungslösung: 1% BSA (Roth) in 1x TBS
10. Verdünnung der Prä- und Antisera von Kaninchen (1:200 und 1:500) in 1x TBS + 0,5% BSA (50-100fach niedrigere Verdünnung bei affinitätsgereinigten Sera)
11. AP-Konjugat: Anti-Rabbit IgG (Fc), AP Conjugate (Promega): 1:1000 Verdünnung in 1x TBS
12. Nachweispuffer (0,05 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-Puffer, pH 9,5, autoklaviert und bei RT aufbewahrt)
12. Stammlösung NBT/BCIP (Roche, Mannheim)
13. Substratlösung: 200 µl Stammlösung NBT/BCIP zu 10 ml Nachweispuffer
14. TE-Puffer: Kapitel 3.3.1
15. Phytohistol® (Roth)

Vorgehensweise:

Die Isolierung der Parasiten erfolgte wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben. Ganze Filarien wurden in Bouin-Fixierlösung 90 min bei RT fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (je 1 h 30%, 50%, 70%, 90%, 96%, abs. Ethanol) und in Methylbenzoat über Nacht inkubiert. Um die Würmer bei der Einbettung besser lokalisieren zu können wurden dem 96%igen Ethanol einige Tropfen Chromotrop 2R zugesetzt. Vor der Einbettung erfolgte eine Inkubation in Benzen (zweimal 5 min).

Die Parasiten wurden danach zunächst 2 h in 60°C warmem Paraplast inkubiert, bevor die vollständige Gewebeeinfiltration in frischem, filtriertem Paraplast in Ausgiessformen bei

60°C über Nacht erfolgte. Zur Aushärtung wurden die Schälchen schnell auf Eis abgekühlt. Die Paraplastblöcke wurden mit einer Rasierklinge so getrimmt, dass die spätere Schnittfläche eine Trapezform hatte (Schnittfläche nicht grösser als 5 x 5 mm) und mit einem heissen Spatel auf Holzblöckchen aufgeschmolzen.

Zur Herstellung der Schnitte wurde ein Schlittenmikrotom Histoslides 2000 R (Jung Leica) verwendet. 5 µm-Schnitte wurden mit einem Rosshaarpinsel (Nr. 1) auf die Oberfläche eines 42°C-Wasserbades überführt und mit einem Objektträger aufgenommen. Anschliessend wurden sie bei 37°C getrocknet und zum Schmelzen vom Paraplast und zur Fixierung der Schnitte an den Objektträger 3 h bei 60°C, und dann über Nacht bei 45°C inkubiert.

Die Schnitte wurden dreimal 4 min in Rotihistol (Xylol-Ersatz) deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (dreimal 3 min 96%, je 5 min 90%, 70%, 50% Ethanol). Anschliessend wurden die Objektträger 5 min in 1x TBS verbracht, wonach die einzelnen Schnitte mit dem PAP-Stift umrandet wurden. Zur Blockierung wurden 200 µl Blockierungslösung pro umrandeten Schnitt aufgetragen, gleichmässig innerhalb der Umrandung verteilt und in einer feuchten Kammer bei 37°C 1 h im Wärmeschrank inkubiert. Anschliessend wurde die Blockierungslösung abgesaugt (Wasserstrahlpumpe) und durch verdünntes Test- oder Kontrollserum (200 µl) ersetzt. Als Negativkontrolle diente die entsprechende Verdünnung des Präimmunsersums. Die Schnitte wurden erneut 1 h in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Serums wurde auf jeden Schnitt fünfmal grosszügig 1x TBS aufgetropft und wieder abgesaugt. Nach dem letzten Waschschritt wurde das TBS durch AP-Konjugat-Verdünnung ersetzt. Nach 30 min bei 37°C wurde das AP-Konjugat entfernt. Die Schnitte wurden fünfmal mit 1x TBS gewaschen und 5 min in Nachweispuffer äquilibriert. Zur Entwicklung wurden die Schnitte mit der Substratlösung (200 µl) überschichtet und im Dunkeln 3 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einlegen der Objektträger in eine Glas-Küvette mit TE-Puffer gestoppt. Um die Präparate zu fixieren, wurden sie mit einer Mischung aus 1 Volumen Phytohistol und 0,5 Volumen ddH<sub>2</sub>O abgedeckt und mit einem Deckglas blasenfrei eingedeckelt.



### 3.11.1.2 Kryoschnitte

#### Material:

1. Fixierlösung: 1x PBS (Kapitel 3.1.2.3) mit 4% Formaldehyd (Merck, Darmstadt)
2. Sucrose-Lösung: 30% Sucrose (Sigma, Deisenhofen) in PBS, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt
3. OCT-Compound (Miles, Elkhart, USA)
4. Alkoholreihe: 30%, 50%, 70%, 90%, 96% abs. Ethanol (Merck)
5. Aluminiumförmchen: aus Aluminiumfolie wurden 3 cm hohe und 0,5 cm im Durchmesser grosse Gefässe geformt
6. Materialien 6. bis 15. wie im Kapitel 3.11.1.1

#### Vorgehensweise:

Die Isolierung der Parasiten erfolgte wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die Fixierung der frisch gewonnenen Filarien ( $n = \text{ca. } 20$ ) erfolgte durch Inkubation für 1 h bei 4°C in der Fixierlösung. Anschliessend wurden sie in 50 ml Sucroslösung verbracht und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Sucrose-behandelten Nematoden wurden dann in die Aluminiumform gegeben, mit ca. 2 ml OCT-Compound überschichtet und für 1 h bei –80°C eingefroren. Für die Herstellung der Gefrierschnitte wurde der Block mit den gefrorenen Würmern mit OCT auf einen auf –30°C vorgekühlten Halter fixiert und in den Kryostat (Jung Frigocut 2800E, Leica, Nussloch) eingespannt. Bei –30°C wurden 6  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte hergestellt und auf die Objektträger gebracht. Es folgte eine Inkubation bei 45°C über Nacht im Wärmeschrank und Lagerung bis zur Wiederverwendung bei –80°C. Das weitere Vorgehen erfolgte wie im Kapitel 3.11.1.1 beschrieben.

### 3.12 IIFT mit intakten, intrauterinen Embryonalstadien (Flotationsverfahren)

#### Material:

1. IIFT-Stamm-puffer (10x): 85,0 g NaCl + 12,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml, pH 7,3
2. „Antifading“-Puffer: 0,01 g Paraphenylendiamin (Sigma) wurden in 9 ml Glycerol (Ultra Pure, ICN) und 0,8 ml 1x PBS (vgl. Kapitel 3.1.2.3) gelöst. Der pH-Wert wurde mit einer gesättigten Bicarbonatlösung auf 9,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C
3. Verdünnung der Prä- und Antisera von Kaninchen 1:50 bis 1:400 (50-100fach niedrigere Verdünnung bei affinitätsgereinigten Sera) in 1x IIFT-Puffer + 2% (w/v) BSA (Roth)
4. Anti Rabbit IgG (whole molecule) FITC Conjugate (Sigma): 1:20 Verdünnung in 0,2% Evans-Blue-Lösung [0,2% (w/v) Evans-Blue (Serva) in 1x IIFT-Puffer]
5. Objektträger (geputzt /gebrauchsfertig, IDL, Nidderau)

Vorgehensweise:

Die Isolierung von intakten, intrauterinen Embryonalstadien erfolgte wie im Kapitel 3.2.3 beschrieben. Alle nachfolgenden Schritte wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Die Embryonalstadien wurden unmittelbar nach der Isolierung dreimal mit 1x IIFT-Puffer gewaschen [3.000 rpm (SK 54.94/24x3g; Hettich), 3 min, Entfernen des Überstandes, Auffüllen mit 1 ml 1x IIFT-Puffer]. Anschliessend wurden 100 µl Embryonalstadien-Suspension in 1x IIFT-Puffer zu 400 µl verdünntem Testserum gegeben und bei 37°C unter leichtem Schwenken 1 h inkubiert. Danach wurde wie oben beschrieben fünfmal gewaschen und das nach der letzten Waschung erhaltene Pellet in 100 µl Konjugatverdünnung resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min im Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln wurde mit 1x IIFT-Puffer mehrmals gewaschen bis der Überstand farblos wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde etwas 1x IIFT-Puffer zurückgelassen und mit 2-3 Tropfen ‚Antifading‘-Puffer versetzt. 20 µl der Suspension wurden auf einen Objektträger aufgetropft, mit einem Deckglas versehen und mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Diaplan Fluoreszenzmikroskop, Leitz) untersucht.

### 3.13 Computer-Programme zur Sequenz-Analyse und Internet URL-Adressen

Zum Sequenzvergleich und zur Homologiesuche wurden die in Tabelle 3-8 zusammengestellten Programme und Internet URL-Adressen genutzt.

**Tabelle 3-8: Verwendete Computer-Programme und Internet URL-Adressen:**

Programme im Internet	URL-Adresse
<b><i>übergreifend</i></b>	
CMS Molecular Biology Resource	<a href="http://restools.sdsc.edu/">http://restools.sdsc.edu/</a>
European Molecular Biology Laboratory (EMBL)	<a href="http://www.embl-heidelberg.de/">http://www.embl-heidelberg.de/</a>
European Bioinformatics Institute (EBI) Toolbox	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.html</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
ExPASy Molecular Biology Server	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
Center for Biological Sequence Analysis (CBS)	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/">http://www.cbs.dtu.dk/services/</a>
WebGene	<a href="http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/">http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/</a>
<b><i>Datenbanksuche</i></b>	
NCBI BLAST Home Page	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
BlaxterLab Nematode Blast Server	<a href="http://nema.cap.ed.ac.uk/ncbi_blast.html">http://nema.cap.ed.ac.uk/ncbi_blast.html</a>
TIGR Brugia Blast Search	<a href="http://tigrblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=bmal">http://tigrblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=bmal</a>
MS BLAST Search at EMBL	<a href="http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html">http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html</a>
Vector Search Engine	<a href="http://www.redasoft.com/rsn/vectorsearch.htm">http://www.redasoft.com/rsn/vectorsearch.htm</a>
<b><i>Sequenz-Analyse</i></b>	

The Sequence Manipulation Suite	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/index.html">http://www.bioinformatics.org/sms/index.html</a>
Sequence Extractor	<a href="http://ingene2.upm.edu.my/se/">http://ingene2.upm.edu.my/se/</a>
Primer3 (Primerdesign)	<a href="http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi">http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi</a>
ClustalW-multipler Sequenzvergleich	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
BoxShade Server; BOXSHADE 3.21	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html</a>
BOXSHADE (Hofmann, Baron)	<a href="http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade-simple.html">http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade-simple.html</a>
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
Signalpeptid-Vorhersage	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
Codon usage-Tabellen	<a href="http://www.kazusa.or.jp/codon/">http://www.kazusa.or.jp/codon/</a>
Clone Manager Programm	
<b>Nematoden-Server</b>	
Blaxter lab Nematode Genomics (BaNG)	<a href="http://www.nematodes.org/">http://www.nematodes.org/</a>
The Filarial Genome Network	<a href="http://nema.cap.ed.ac.uk/fgn/filgen.html">http://nema.cap.ed.ac.uk/fgn/filgen.html</a>
Caenorhabditis elegans WWW Server	<a href="http://elegans.swmed.edu/">http://elegans.swmed.edu/</a>

### 3.14 Hinweise zu Sequenzvergleichen

Vergleiche der hier erarbeiteten nt- und AS-Sequenzen mit solchen bei *Litomosoides sigmodontis* und *Brugia* spp. beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf die Untersuchungen von HIRZMANN et al. (2002).

## 4.

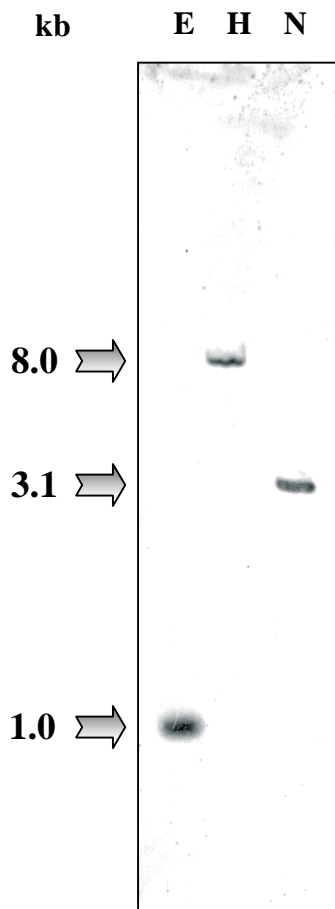
## ERGEBNISSE

### 4.1 *Av-shp3a*

#### 4.1.1 Bestätigung der Existenz von *Av-shp3a*

Zu Beginn dieser Arbeit sollten die bisherigen, auf PCR beruhenden Ergebnisse (vgl. Kapitel 8.1), nach denen bei *A. viteae* ein *shp3a*-Gen mit Homologie zu *L. sigmodontis* und *B. malayi* existiert, durch Southern Blot-Analysen bestätigt werden.

Hierfür wurde genomische DNA von *A. viteae* mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, und der Southern Blot mit einer amplifizierten *Av-shp3a*-Sonde (472 bp, 2363-2826 in der *Av*-Sequenz) hybridisiert. Diese Sonde enthält das gesamte zweite Exon mit 78% der kodierenden Sequenz und eine randständige *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle. Als Matrize für die PCR-Amplifikation der Digoxigenin-markierten Sonde diente genomische *A. viteae*-DNA; als Primer wurden Av3-3 und Av3-4 (vgl. Abb. 4-2) eingesetzt.



**Abbildung 4-1: Southern Blot-Analyse von *Av-shp3a*.**

*A. viteae*-DNA wurde mit den Enzymen *EcoRI* (E), *HindIII* (H) und *NsiI* (N) gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet, und mit einer Digoxigenin-markierten *Av-shp3a*-Sonde hybridisiert. Nach Vorliegen der gesamten genomischen *A. viteae*-Sequenz (Abb. 4-10) und Identifizierung der Restriktionsschnittstellen für die drei Enzyme sowie Bestimmung der Grösse der Fragmente, welche für eine Hybridisierung mit dieser Sonde in Frage gekommen wären, erfolgte ein Vergleich mit den im Southern Blot positiv reagierenden Fragmenten. Das DNA-Fragment der *EcoRI* (963 bp, 2448-3411 in der gen. Sequenz)-, sowie der *NsiI* (3085 bp, 1183-4268)-Restriktionsspaltung konnten anhand der Grösse den positiv reagierenden Banden des Southern Blots eindeutig zugeordnet werden. Für *HindIII* konnte nur ein Restriktionsschnitt (3959) in der vorliegenden genomischen Sequenz ermittelt werden.

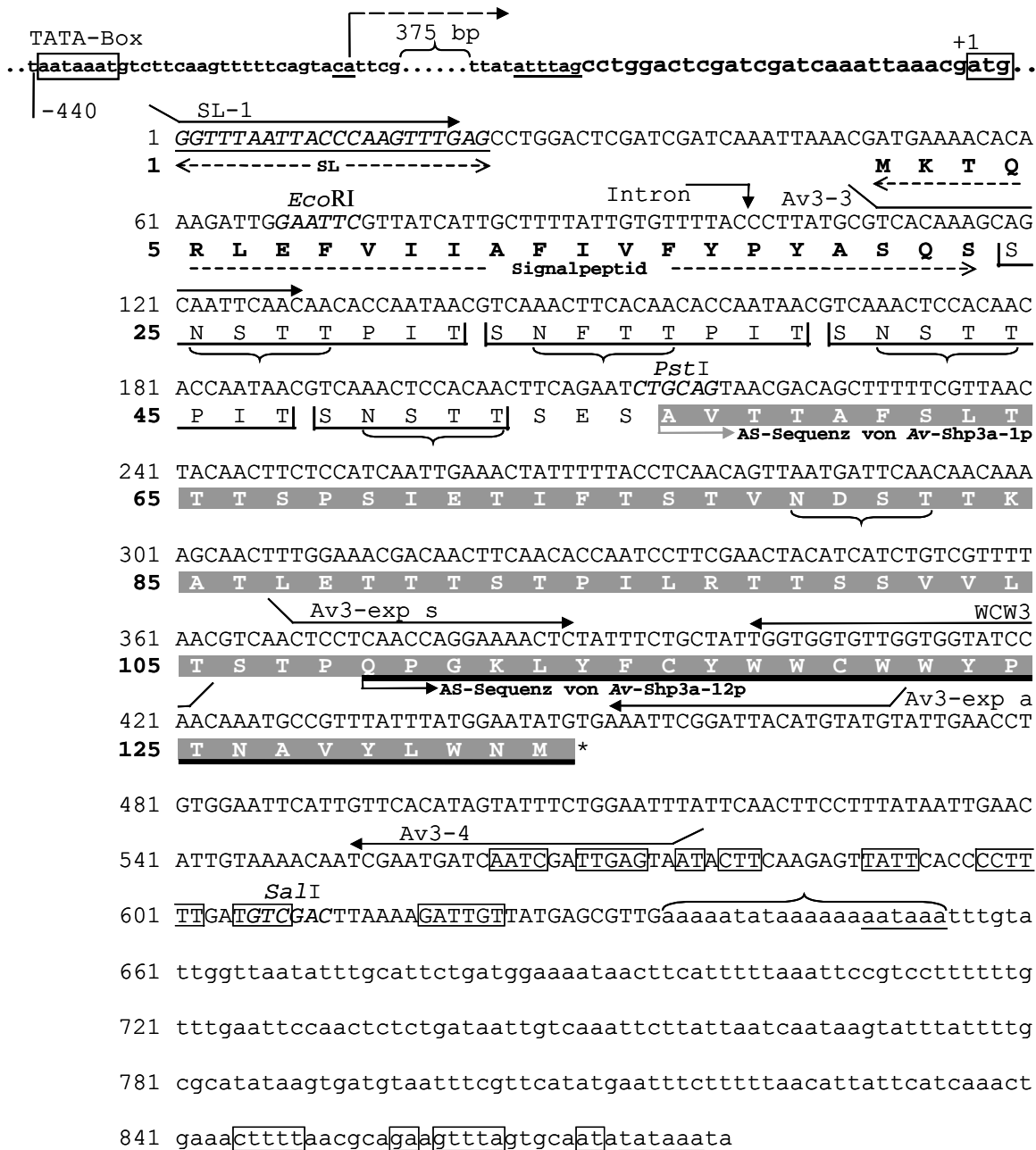
Das Auftreten von jeweils nur einer Bande (Abb. 4-1) deutet daraufhin, dass es sich bei *Av-shp3a* um ein Single-Copy-Gen handelt.

Anhand der später erarbeiteten genomischen Sequenz von *Av-shp3a* ist ersichtlich, dass ein weiteres *EcoRI*-Fragment (240 bp, 2208-2448, Abb. 4-9) zu erwarten gewesen wäre, welches jedoch auf dem Southern Blot der Abb. 4-1 fehlte. Als Ursache ist anzunehmen, dass derartig kleine Fragmente im Zuge der Elektrophorese aus dem Gel ‚herauslaufen‘ und deswegen nicht auf der Nylon-Membran vorhanden waren.

#### 4.1.2 cDNA und abgeleitete AS-Sequenz

Das 5'-Ende der cDNA von *Av-shp3a*, die Kodierregion und die 3'-Sequenz bis zur *SalI*-Restriktionsschnittstelle an Position 606-611 (Abb. 4-2) sowie die genomische Sequenz von der Promotorregion bis zu dem Tryptophan-reichen Motiv waren vor Beginn dieser Studie bekannt (HIRZMANN & ZAHNER, 2000; vgl. Kapitel 8.1). Am 5'-Ende der *Av-shp3a*-cDNA befindet sich die vollständige 22nt-*Trans*-Spleiss-,Leader'-Sequenz (Abb. 4-2). Die zum 5'-Ende der cDNA korrespondierende genomische Sequenz mit dem *Trans*-Spleiss-Akzeptor ist in Abb. 4-2 über der cDNA aufgeführt. Aufgrund der *Trans*-Spleiss-Prozessierung stimmt das 5'-Ende der ‚reifen‘ mRNA nicht mit dem Transkriptionsstart überein.

Um das 3'-Ende der *Av-shp3a*-cDNA zu bestimmen wurde eine PCR mit revers transkribierter *A. viteae*-♀ polyA<sup>+</sup>-RNA, mit den Primern Av3-3 und (dT)<sub>21</sub>-Sal/Xho durchgeführt. Das amplifizierte 560 bp-Fragment wurde aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *PstI* (Abb. 4-2) und *XhoI* (Adapter vom dT<sub>21</sub>-Primer) gespalten, in einen ebenfalls mit *PstI* und *XhoI* geschnittenen Plasmid-Vektor pBSK kloniert und danach doppelsträngig sequenziert.



**Abbildung 4-2: cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz von *Av-shp3a*.**

Die dargestellte 880 bp-lange Sequenz wurde aus zwei cDNA Fragmenten, die durch RT-PCR mit den Primerkombinationen SL-1/WCW3 und Av3-3/(dT)<sub>21</sub>-Sal/Xho gewonnen wurden, und aus der sich anschliessenden genomischen Sequenz (kleine Buchstaben) zusammengestellt. Die verwendeten Primer und im Text erwähnte Restriktionsstellen sind eingezeichnet. In der abgeleiteten AS-Sequenz sind das Signalpeptid, die vier nahezu identischen repetitiven Peptide und die Sequenz der rekombinanten Proteine Av-Shp3a-1p und -12p hervorgehoben. Fünf potentielle, durch computergestützte Vorhersage bestimmte N-Glykosylierungsstellen, vier davon in den repetitiven Peptiden, sind durch Klammern unter der Sequenz angegeben. Der *Trans*-Spleiss-, 'Leader', die Position des Introns im genomischen Klon und potentielle Polyadenylierungs-Sequenzen (unterstrichen) sind ebenfalls gekennzeichnet. Eine interne Poly (dA)-Sequenz (Klammer über der Sequenz), an die der (dT)<sub>21</sub>-Sal/Xho-Primer gebunden hatte, sowie identische Basen bei *A. viteae*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* im 3'-flankierenden Bereich sind durch einen Rahmen hervorgehoben. Über der cDNA ist mit fettgedruckten Kleinbuchstaben die korrespondierende genomische Av-Sequenz dargestellt, wobei die Numerierung auf dem ATG-Start-Kodon basiert. Der bei *Ls-shp3* und -3a durch 5'-RACE-PCR bestimmte Transkriptionsstart ist durch einen Strichpfeil gekennzeichnet. Das CA-Dinukleotid des potentiellen CAP-Signals und die *Trans*-Spleiss-Akzeptor-Sequenz sind unterstrichen.

Die 5'-Sequenz dieses 3'-cDNA Klons überlappte identisch mit dem 5'-cDNA-Klon, aber das 3'-Ende (Nukleotid-Sequenz mit grossen Buchstaben in Abb. 4-2) entsprach nicht der Polyadenylierungsstelle, sondern endet schon vor dem ersten potentiellen Polyadenylierungssignal, wie die anschliessende genomische Sequenzierung ergab. Der (dT)<sub>21</sub>-Sal/Xho-Adapter-Primer hatte offensichtlich an die interne Poly (dA)-Sequenz (auf Abb. 4-2 mit einer Klammer hervorgehoben, 17x Adenin und 3x Thymidin) hybridisiert. Am 3'-Ende wurde die cDNA-Sequenz daher durch die sich anschliessende genomische Sequenz ergänzt.

Die Aminosäuresequenz von *Av-shp3a*, die von der genomischen Sequenz nach Vergleich mit den amplifizierten cDNA-Fragmenten abgeleitet wurde und mit dem ersten Methionin-Kodon nach der *Trans*-Spleiss-Akzeptorstelle beginnt, ergibt ein Polypeptid von 133 AS (123 AS für *Ls-shp3a* und 140 AS für *Bm-shp3a*). Wie bei *shp3* und *shp3a* von *Brugia* spp. und *L. sigmodontis* kann die abgeleitete Sequenz in drei Abschnitte unterteilt werden. Die N-terminale Region (AS 1-23) entspricht einer sekretorischen Standard-Signalsequenz mit einer vorhersagbaren Protease-Schnittstelle zwischen Ser<sup>23</sup> und Ser<sup>24</sup> (Abb. 4-2). Demnach ist der N-Terminus des reifen Proteins die Serin/Threonin-reiche Region [AS 24-108 mit 48 Ser/Thr von 85 AS (57%)], die vier nahezu identische, repetitive Peptide aufweist. Der dritte Abschnitt, die C-terminale Region (AS 109-133), enthält mehrere hydrophobe Aminosäuren und ein besonders auffälliges, bei allen untersuchten Spezies konserviertes Tryptophan-reiches Motiv: WWCWW. Für das ‚reife‘ Polypeptid (ohne Signalsequenz) ergibt sich ein errechnetes Molekulargewicht von 12.04 kDa.

Das ‚reife‘, abgeleitete Polypeptid besitzt auch fünf potentielle N-Glykosilierungsstellen an den Positionen 25, 33, 41, 49 und 79, die mit dem Programm NetNGlyc 1.0 von CBS ermittelt wurden und alle über dem Schwellenwert von 0.5 liegen. Vier dieser N-Glykosilierungsstellen sind jeweils in den nahezu identischen repetitiven Peptiden.

## 4.2 *Av-shp3*

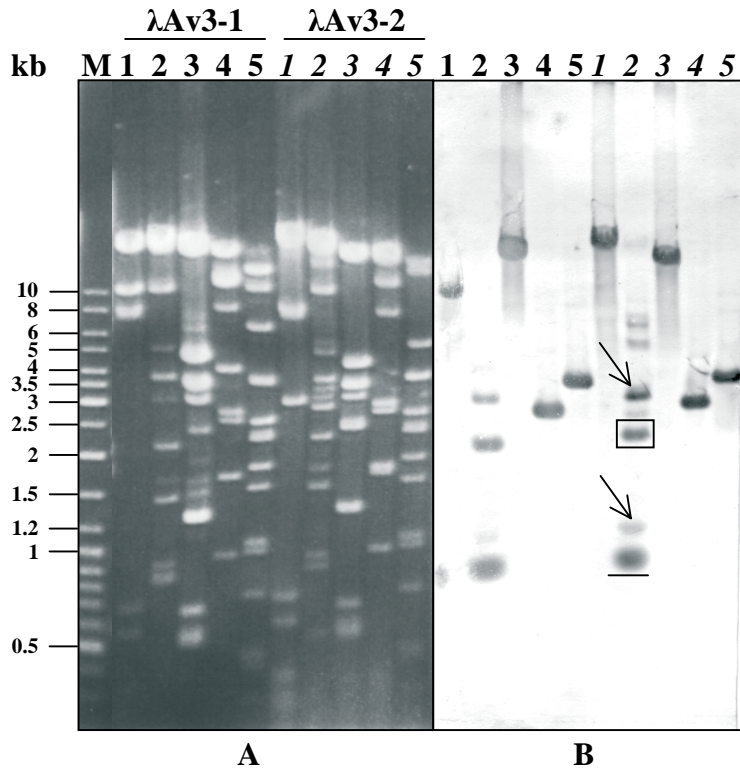
### 4.2.1 Versuch des Nachweises von *Av-shp3* über Kreuzhybridisierung und ‚Long Range‘-PCR

In der Folge sollte geklärt werden, ob ein paraloges Gen *shp3* vorhanden ist, das mit *Av-shp3a* kreuzreagiert. Dies ist bei *L. sigmodontis* der Fall, wo die 3'-kodierenden Bereiche der *shp3a*- und *shp3*-Gene bis zu 97% identisch sind und kreuzreagieren (HIRZMANN, 1997).

Die homologen Gene *shp3a* und *shp3* sind bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* in einem Tandem mit einem Abstand von 5,5 kb organisiert (HIRZMANN et al., 2002). Um festzustellen, ob bei *A. viteae* ein orthologes Gen *shp3* vorhanden ist, wurde eine genomische Phagenbank mit derselben Sonde aus dem 3'-kodierenden Bereich von *Av-shp3a* (Kapitel 4.1) gescreent und positive Klone wurden analysiert. Bei der verwendeten genomischen *A. viteae*-Bank handelte es sich um eine  $\lambda$ DASH-II-Bank. Für die Vermehrung der Phagen wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue-MRA eingesetzt. Die Titerbestimmung ergab einen Wert von  $1,1 \times 10^9$  pfu/ml. Es konnten zwei positive Klone isoliert werden ( $\lambda$ Av3-1 und  $\lambda$ Av3-2).

Von beiden genomischen Klonen wurde Phagen-DNA für eine Southern Blot-Analyse isoliert. Die DNA wurde mit *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Nsi*I und *Pst*I gespalten. Die Fragmente wurden auf einem 0,7 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4-3A) und auf eine Nylon-Membran gebロットet. Als Sonde für die Hybridisierung wurde ein Digoxigenin-markiertes PCR-Fragment aus dem *Av-shp3a*-Gen eingesetzt, das die vollständige Sequenz zwischen Promoter und der *Pst*I-Restriktionsschnittstelle im zweiten Exon umfasst (ein Amplifikat mit dem Sense-Oligonukleotid Pro1 und dem Antisense-Oligonukleotid Av3-2, 1266 bp, 2710-3975 in der *Av*-Sequenz, Abb. 8-2). Abbildung 4-3B zeigt das Ergebnis der Hybridisierung nach Farbreaktion. Die Grösse der hybridisierenden Bande bei der *Nsi*I-Spaltung (3.1 kb) ist mit dem Ergebnis der genomischen Southern Blot-Analyse (Abb. 4-1) identisch. Das gleiche gilt für die 1.0 kb grosse Bande bei *Eco*RI-Spaltung (in Abb. 4-3B unterstrichen).





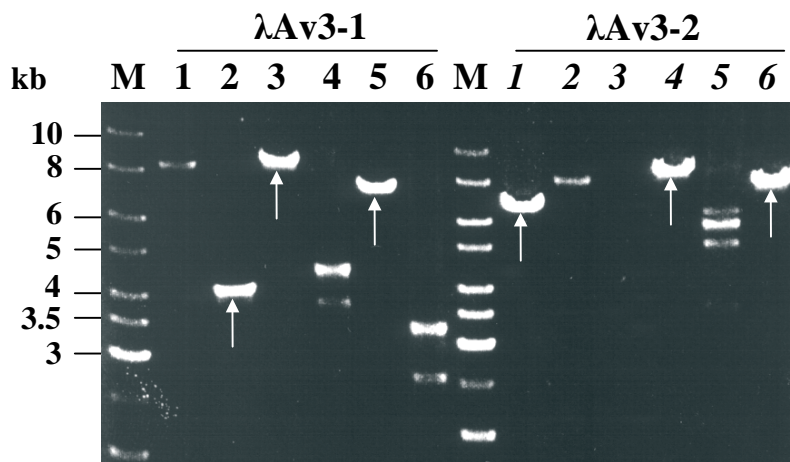
**Abbildung 4-3: Southern Blot- Analyse der genomischen Phagenklone λAv3-1 und λAv3-2.**

Beide Klone enthalten das *Av-shp3a*-Gen. Jeweils 5 µg Phagen-DNA wurde einzeln mit den Enzymen *Bgl*III (1), *Eco*RI (2), *Eco*RV (3), *Nsi*I (4) oder *Pst*I (5) gespalten und auf einem Agarosegel aufgetrennt (A, Gelphoto). Der Southern Blot wurde mit einer *Av-shp3a*-Sonde hybridisiert (B), die einen internen *Eco*RI-Schnitt aufweist.

Die hybridisierende 3.9 kb Bande bei der *Pst*I-Spaltung, sowie das 2.4 kb-Fragment nach der *Eco*RI-Spaltung (umrandet) konnten anhand der Grösse nach späterem Vorliegen der gesamten genomischen Sequenz den entsprechenden genomischen Fragmenten (3894 bp, 2719-6613, bzw. 2422 bp, 3411-5833 in der *Av*-Sequenz, Abb. 4-10) zugeordnet werden. Die zwei hybridisierenden Banden der *Eco*RI-Spaltung, die auf der Abb. 4-3B mit Pfeilen markiert sind, resultieren, wie die spätere Sequenzanalyse ergab, aus einer partiellen Spaltung der Phagen-DNA mit *Eco*RI (2448-5833 und 2208-3411 bp in der genomischen *Av*-Sequenz). Diese Southern Blot-Analyse zeigte, dass beide Klone, λAv3-1 und λAv3-2, das Gen *Av-shp3a* enthalten. Die Hybridisierung von zwei *Eco*RI-Banden war aufgrund der vorliegenden cDNA-Sequenz zu erwarten, da die hier eingesetzte Sonde im Unterschied zur Sonde bei der genomischen Southern Blot-Hybridisierung (Abb. 4-1) einen internen *Eco*RI-Schnitt aufwies. Obwohl diese längere DNA-Sonde die hochkonservierte Promoter-Sequenz enthielt, kam es aber nicht zu einer Kreuzhybridisierung mit einem möglicherweise vorhandenen paralogen Gen *Av-shp3*, wie das der Fall bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* ist (HIRZMANN et al., 2002).

Unter der Annahme, dass ein solches *shp3*-Gen bei *A. viteae* existiert, bestand die Möglichkeit, dass beide Phagenklone λAv3-1 und λAv3-2 nicht lang genug waren, um den entsprechenden Genbereich zu enthalten [bei *Brugia* und *Litomosoides* beträgt der Abstand

der gleichgerichteten Gene *shp3a* und *shp3* mehr als 5 kb (HIRZMANN et al., 2002)] oder dass die Sequenz derart verändert ist, dass eine Kreuzhybridisierung unter den gewählten stringenten Bedingungen (0.2x SSC, 60°C) nicht möglich war. Um diese Fragestellung zu untersuchen sollte zunächst ein Abschnitt von 6 kb stromabwärts von *Av-shp3a* durch Sequenzierung analysiert werden. Dafür wurde die Länge der das *Av-shp3a*-Gen flankierenden Sequenz von beiden genomischen Klonen durch ‚Long Range‘-PCR bestimmt, wobei drei Primer aus dem *Av-shp3a*-Gen in Kombinationen mit Vektorprimern eingesetzt wurden (Abb. 4-4).



**Abbildung 4-4: ‚Long Range‘-PCR-Analyse der genomischen Phagenklone λAv3-1 und λAv3-2.**

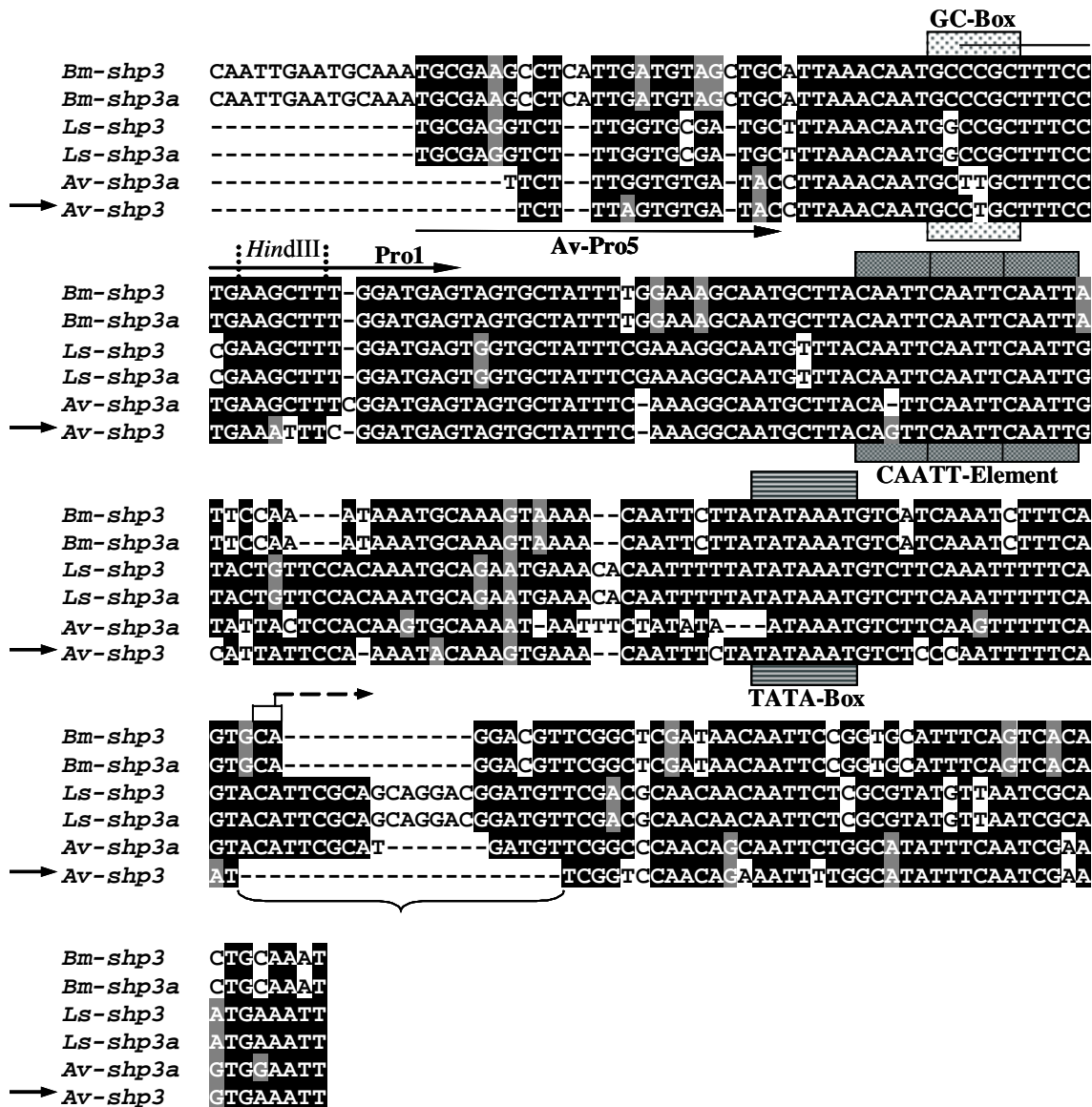
Als Matrize wurde Phagen-DNA eingesetzt und als Primer ein Sense-Oligonukleotid aus der Promoter-Sequenz (Pro1), ein Sense- und ein Antisense-Oligonukleotid aus der *Av-shp3a*-Kodierregion (Av3-3 und Av3-2) sowie die zwei Vektorprimer T3 und T7. Weisse Pfeile markieren die spezifischen Amplifikate: 1: Av3-2 und T3; 2: Av3-2 und T7; 3: Pro1 und T3; 4: Pro1 und T7; 5: Av3-3 und T3; 6: Av3-3 und T7

Die spezifischen Amplifikate, die sich aus der Orientierung der eingesetzten Primer-Paare ergeben, sind in der Abb. 4-4 durch Pfeile markiert. Die ‚Long Range‘-PCR-Analyse zeigte, dass beide genomischen Klone stromabwärts vom *Av-shp3a*-Stopp-Kodon noch ca. 7 kb enthalten, da die PCR-Produkte mit dem Sense-Primer Pro1 und dem Vektorprimer T3 (bei λAv3-1) bzw. T7 (bei λAv3-2) ca. 8.5 kb lang sind und der Abstand zwischen der Sequenz vom Primer Pro1 und dem Stopp-Kodon von *Av-shp3a* 1.5 kb beträgt. Stromaufwärts des *Av-shp3a*-Gens enthält der Klon λAv3-1 etwa 4 kb, der Klon λAv3-2 etwa 6.7 kb zusätzliche Sequenz.

#### 4.2.2 Sequenz-Analyse des *Av-shp3*-Promotor-Bereiches

Die Ansequenzierung von Phagenklon  $\lambda$ Av3-1 mit dem Vektor-Primer T3 (ca. 500 nt; als Template diente das PCR-Produkt Av3-3/T3; es handelt sich um den Bereich ca. 7 kb stromabwärts von *Av-shp3a*) lieferte keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines paralogen Gens *Av-shp3*. Damit war zumindest nicht anzunehmen, dass *Av-shp3a* und ein möglicherweise existentes *Av-shp3*-Gen in der gleichen genomischen Orientierung zueinander liegen wie die homologen Gene bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* (vgl. HIRZMANN et al., 2002). Die weitere Sequenzierung (wiederum ca. 500 bp Richtung *Av-shp3a*) mit dem Primer Av3-13 ergab eine Sequenz mit hoher Homologie zum 5'-Bereich einer *O. volvulus* cDNA (mehrere Einträge in der Datenbank - u.a. SWOVmfCAR09F09SK; Identität 96%; 159/165 nt; in der *Av*-Sequenz 486-725; Abb. 4-17) und zum N-Terminus des hypothetischen Proteins C29F5.1 von *C. elegans* (Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz 96%; 53/55 AS; Abb. 4-18). Bei dieser Sequenz handelt es sich vermutlich, auch aufgrund der potentiellen Spleiss-Stellen, um das erste Exon eines *C29F5.1*-homologen Gens bei *A. viteae* (*AvC29F5.1*; vgl. Kapitel 4.4.1).

Die Ansequenzierung von Phagenklon  $\lambda$ Av3-2 mit dem Primer T3 (als Template diente das PCR-Produkt Av3-2/T3; es handelt sich um den Bereich ca. 6 kb stromaufwärts von *Av-shp3a*) ergab eine starke Homologie zu der Promotorregion von *Bm-shp3/3a* (88% Identität; 69/78 nt), *Ls-shp3/3a* (83% Identität; 133/159 nt) sowie *Av-shp3a* (92% Identität; 117/126 nt; Abb. 4-5). Aufgrund dieser Homologie war zu vermuten, dass es sich bei dieser Sequenz um den konservierten Promotor-Bereich des paralogen Gens *Av-shp3* handelte. Die fehlende Kreuzhybridisierung in den zuvor beschriebenen Southern Blot-Analysen deutete aber darauf hin, dass *Av-shp3* im Vergleich zu *Av-shp3a* einen stark veränderten Kodierbereich haben muss. Die Orientierung von *Av-shp3a* und dem *Av-shp3*-Promoter ist im Unterschied zu *B. malayi* und *L. sigmodontis* divergent. Die Abbildung 4-5 zeigt einen Homologievergleich der 5'-flankierenden Sequenzen (Promotoren) der Gene *shp3* und *shp3a* von *B. malayi*, *L. sigmodontis*, und *A. viteae*, wobei bei *Av-shp3* zu diesem Zeitpunkt nur die Promoter-Sequenz bekannt war. Über eine Länge von 198 bp besteht unter den 6 Promotor-Sequenzen eine Identität von 75%.



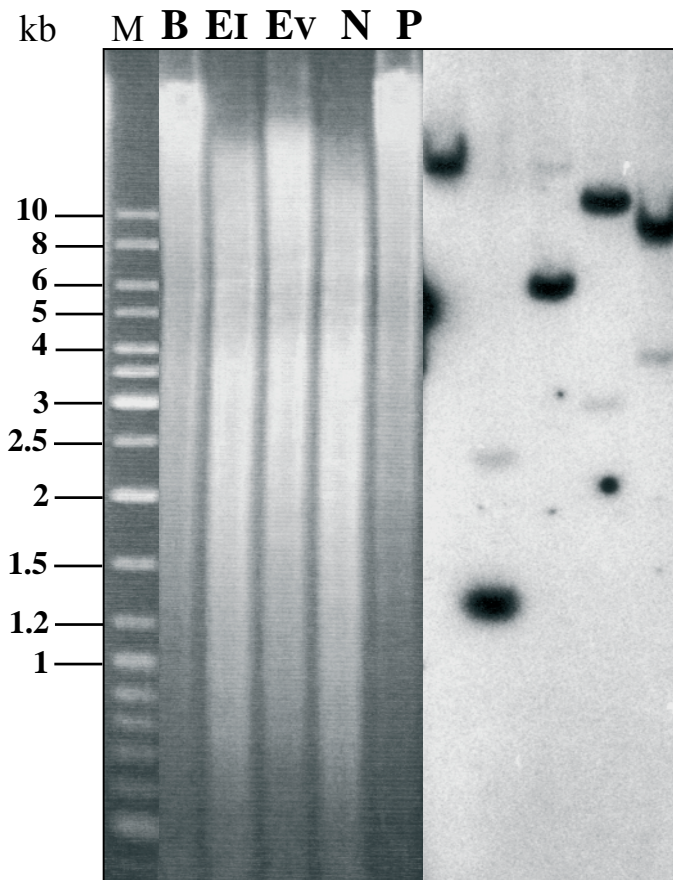
**Abbildung 4-5: Homologievergleich der *shp3a*- und *shp3*-Promotor-Sequenzen von *B. malayi*, *L. sigmodontis* und *A. viteae*.**

Die TATA-Box-Sequenz, eine GC-Box und ein repetitives CAATT-Sequenzelement sind hervorgehoben. Das Oligonukleotid Av-Pro5, das für die spätere Sondenherstellung mittels PCR verwendet wurde, und das Oligonukleotid Pro1, das für die erste genomische Amplifikation von Av-*shp3a* eingesetzt wurde, sind mit ihrer Orientierung eingezeichnet. Mit einer Klammer ist ein Bereich markiert, in dem bei Av-*shp3* verglichen mit Av-*shp3a* 15 Nukleotide fehlen. Die Position der konservierten HindIII-Restriktionsstelle (bei allen mit Ausnahme von Av-*shp3*) ist mit Punkten angedeutet. Der durch 5'-RACE-PCR für *shp3a* und *shp3* von *L. sigmodontis* bestimmte Transkriptionsstart (vgl. HIRZMANN, et al. 2002) ist durch einen Strichpfeil angegeben; das CA-Dinukleotid des CAP-Signals ist hervorgehoben. Über eine Länge von 198 bp (bezogen auf Av-*shp3*) besteht unter den sechs Promotor-Sequenzen eine Identität von 75%. Identische Nukleotide sind schwarz und ähnliche grau hinterlegt.

#### 4.2.3 Genomische Southern Blot-Analyse von *Av-shp3* und Charakterisierung des *Av-shp3*-Gens

Da der Klon  $\lambda$ Av3-2 nur die Sequenz des *Av-shp3*-Promotors bis zur TATA-Box umfasste, war die Isolierung weiterer genomischer Klone nötig, um auch die Sequenz stromabwärts des *Av-shp3*-Promotors zu analysieren.

Dafür wurde die genomische Phagenbank von *A. viteae* mit einer Digoxigenin-markierten Sonde aus dem 3'-Ende des Phagenklons  $\lambda$ Av3-2 gescreent (PCR-Produkt mit den Primern Av-Pro5 und T3), die die *Av-shp3*-Promotorregion enthält. Die Reaktivität dieser Sonde für das *Av-shp3*-Gen wurde zunächst durch eine genomische Southern Blot-Analyse überprüft. Genomische DNA von *A. viteae* wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Nsi*I und *Pst*I gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und der Southern Blot mit der *Av-shp3*-Promotor-Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert (Abb. 4-6).



**Abbildung 4-6: Southern Blot-Analyse von *A. viteae*-DNA mit einer Sonde aus dem Promoterbereich von *Av-shp3*.**

Je 3 µg genomische DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II (B), *Eco*RI (EI), *Eco*RV (EV), *Nsi*I (N) und *Pst*I (P) gespalten und in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt.

**Links:** Ethidiumbromid-Färbung mit M=Molekulargewichtsstandard M1.

**Rechts:** Chemoluminiszenznachweis der Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *shp3*-Promoter-Sonde (Sequenz von Av-Pro5 bis T3 aus dem Phagenklon λAv3-2, vgl. Abb. 4-5, 270 bp) unter stringenten Bedingungen (0.2x SSC, 60°C). Ausser bei der Spaltung mit *Bgl*II zeigen sich in jeder Spur eine stark und eine schwach reagierende Bande, die sich als *shp3* bzw. *shp3a* zuordnen lassen.

Unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen war eine Kreuzreaktion der *Av-shp3*-Promotor-Sonde mit den *Av-shp3a*-Promotor-Sequenzen zu beobachten, die in schwach reagierenden Banden resultierte. Da die *shp3*-Promotorsonde weder eine *Eco*RI, *Eco*RV, *Nsi*I noch *Pst*I-Restriktionsstelle besitzt, in jeder dieser vier Spuren aber zwei Fragmente hybridisierten, liegen beide Promotoren - *shp3* und *shp3a* - mit nur einer Kopie im Genom vor. Unter weniger stringenten Bedingungen liessen sich mit der *Av-shp3*-Promotor-Sonde für *shp3* und *shp3a* zwei gleich starke Signale erzielen (vgl. Abb. 4-19). Das singuläre Signal in der *Bgl*II-Spur entspricht der engen Kopplung beider Gene (die spätere Analyse der Sequenz ergab wie erwartet keine *Bgl*II-Restriktionsstelle zwischen *Av-shp3a* und *-shp3*).

Nach diesem Nachweis der Spezifität der *Av-shp3*-Promotor-Sonde für das *Av-shp3*-Gen wurde die genomische λDASH-II-Bank von *A. viteae* unter den gleichen Hybridisierungsbedingungen wie beim Southern Blot gescreent. Es wurden drei Klone isoliert - λAv3-3, λAv3-4 und λAv3-5. Die Analyse dieser drei genomischen Phagenklone erfolgte durch ‚Long Range‘-PCR-Amplifikation (mit den spezifischen Primern Av3-2 und Av-Pro5 und den Vektor-Primern T3 und T7) und Sequenzierung geeigneter PCR-Produkte. Klon



**Av** 9789      atctcatttttaatatctcttttttagcaattcgattccaggaagttattacgtaaaaagc  
                  ||||| | ||||| | |||||                   ||||| ||||| ||||| |||||  
**Ls** 10428    atctcactgttaatgtccttttttaatcattcg-ttccaggaacgtattacgtaaaaagc

**Av**                    gaaaccgaataatgccaatatgacaaca-tatgtaatggttgacaaaaacaattccggag  
                  ||| | |||| ||||| || | || ||||| ||||| ||||| ||||| |||  
**Ls**                    gaatgcaaatagtgccagtagcagtgccactatgtaatcgttgacaaaataattccgtaa

**Av**                    ctgtaagatt    9918  
                  ||| || |||  
**Ls**                    ctgcaacatt    10556

Identische Nukleotide sind mit Strichen verbunden; die Identität beträgt 79% (103/130).

Der Abstand zwischen der TATA-Box des *Av-shp3*-Promotors und dieser konservierten Sequenz beträgt bei *A. viteae* 490 bp; bei *L. sigmodontis* ist dieser Abstand jedoch 2830 bp und enthält die Exons 1 und 2 des *Ls-shp3*-Gens (vgl. auch Abb. 4.20). Die starke Homologie zwischen den paralogen Genen *Ls-shp3a* und *-shp3* und *Bm-shp3a* und *-shp3* erstreckt sich bis zum Anfang des zweiten Exons der jeweiligen Gene (Identität 99% bzw. 98%), bei *A. viteae* dagegen beschränkt sich die Homologie zwischen *shp3a* und *shp3* auf die Promotorregion (90% Identität) und endet ca. 80 bp stromabwärts der TATA-Box (Abb. 4-5, 4-20). Diese Ergebnisse deuten möglicherweise auf eine Deletion des Kodierbereiches von *Av-shp3* und erklären auch die fehlende Kreuzhybridisierung der genomischen *shp3*-Fragmente mit der Sonde aus dem 3'-Bereich von *Av-shp3a* (Kapitel 4.1). Die Datenbanksuche in allen sechs Leserastern mit der oben beschriebenen konservierten Sequenz distal des *Av-shp3*-Promoters ergab keine weiteren signifikanten Homologien. Der GC-Gehalt entspricht mit 29% dem von *Brugia*-Introns (HAMMOND, 1994).

### 4.3 Organisation der genomischen *shp3a-shp3*-Region von *A. viteae*

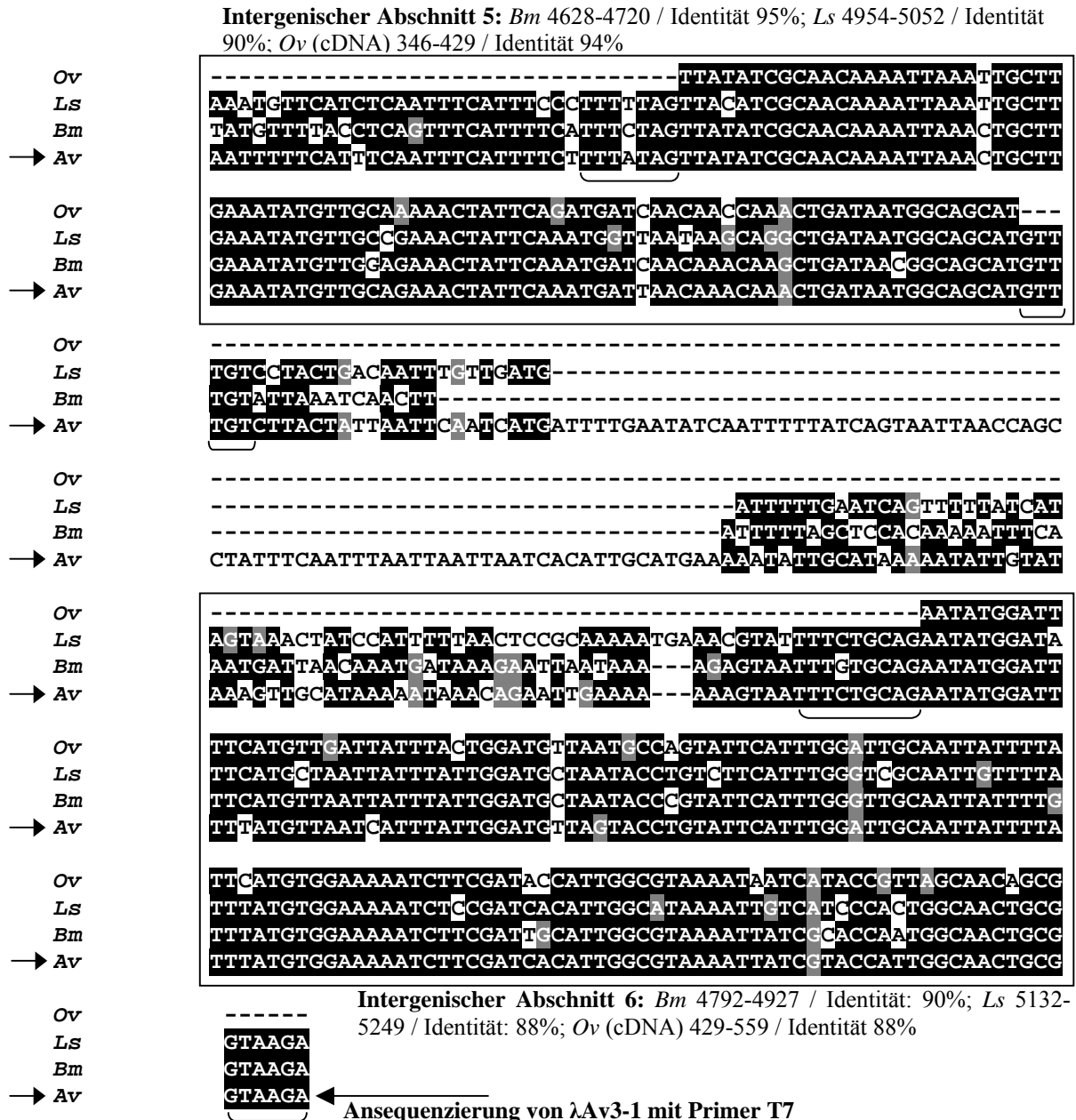
#### 4.3.1 Orientierung von *shp3a/3*

Die Ansequenzierung von Phagenklon  $\lambda$ Av3-1 mit dem Vektor-Primer T7 [ca. 500 nt, etwa 3.3 kb stromaufwärts von *Av-shp3a*; als Template diente das PCR-Produkt Av3-2/T7 (Abb. 4-4)] ergab eine starke Homologie zu den konservierten intergenischen Abschnitten 5 und 6 von *B. malayi* und *L. sigmodontis* (Abb. 4-8) mit der gleichen parallelen Orientierung wie die Promotorregion des *Av-shp3*-Gens. In der genomischen Region zwischen *shp3a* und *shp3* fanden sich bei *B. malayi* und *L. sigmodontis* sieben Abschnitte (1-7) mit hoher Sequenzhomologie (66%-89% Identität; HIRZMANN 1997).

Wegen des erhöhten GC-Gehaltes und der potentiellen Spleiss-Stellen, die nach Prozessierung ein durchgehendes Leseraster ergeben, wurde die Hypothese erstellt, dass diese sieben Abschnitte mehrere Exons eines anderen Gens, welches nachfolgend als Intergen bezeichnet wird, repräsentieren (HIRZMANN et al., 2002). Darüber hinaus wurde eine signifikante Homologie zwischen diesem Intergen und einer cDNA-Sequenz von *O. volvulus* (SWOvAMCAQ02E05SK) gefunden (Abb. 4-8).

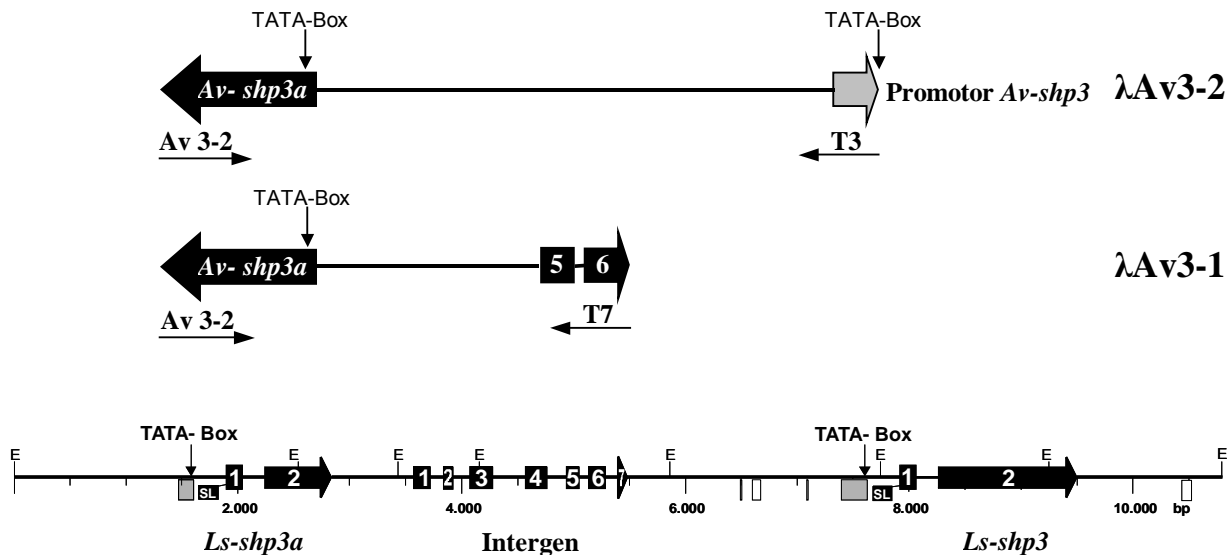
Aufgrund der Sequenzierungsergebnisse der beiden genomischen Phagenklone  $\lambda$ Av3-1 und  $\lambda$ Av3-2 wurde zur Veranschaulichung der genomischen Organisation von *A. viteae* eine vorläufige schematische Darstellung der *shp3a-shp3*-Region im Vergleich zu *L. sigmodontis* erstellt (Abb. 4-9).





**Abbildung 4-8: Homologievergleich der *shp3a-shp3*-intergenischen Abschnitte 5 und 6 von *O. volvulus*, *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *A. viteae*.**

Bei *O. volvulus* wurde für den Vergleich die cDNA SWOvAMCAQ02E05SK aus der Datenbank eingesetzt, bei den anderen drei Spezies die genomischen Sequenzen. Die intergenischen Abschnitte 5 und 6 sind eingerahmt, potentielle Spleiss-Stellen sind hervorgehoben. Die Identität zur *A. viteae*-Sequenz ist für beide Homologieblöcke angegeben. Identische Nukleotide sind schwarz und ähnliche grau hinterlegt.

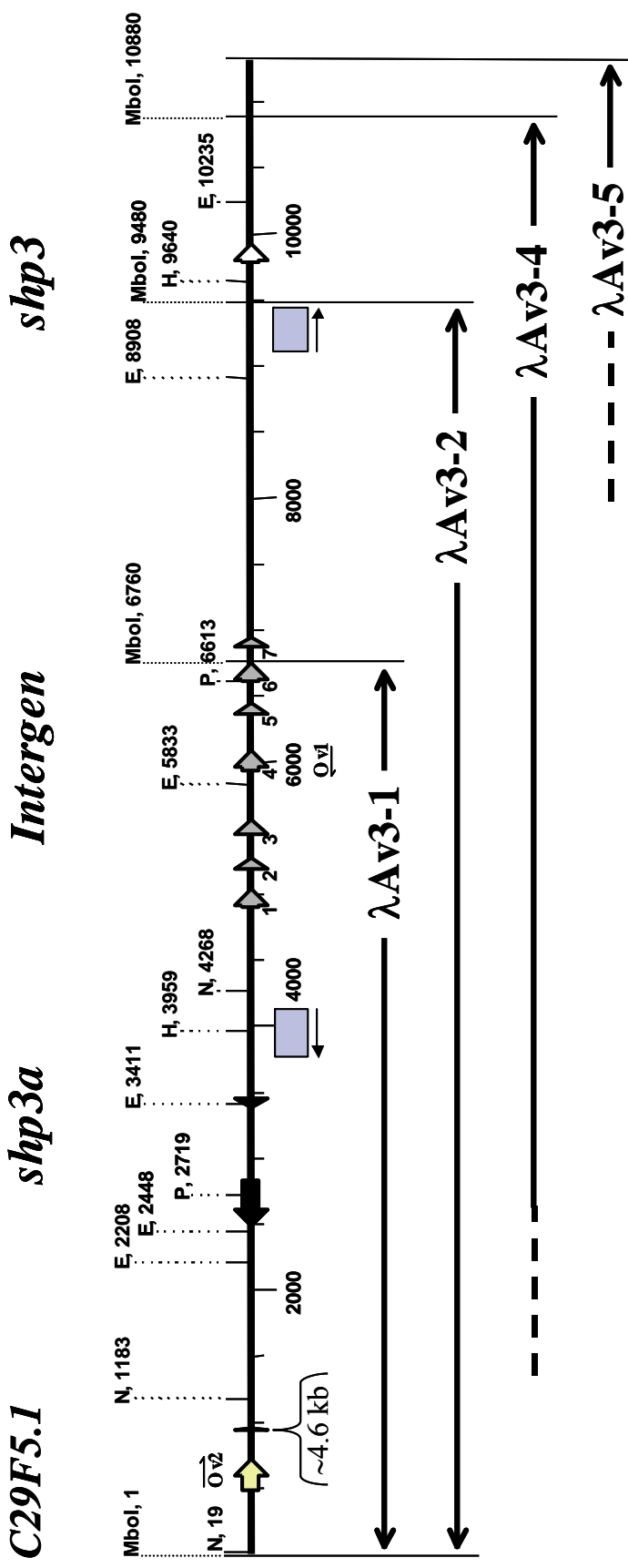


**Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der genomischen *shp3a-shp3* Organisation von *A. viteae* aufgrund der terminalen Ansequenzierung der Phagenklone λAv3-1 und λAv3-2 im Vergleich zur genomischen Organisation dieser Region bei *L. sigmodontis***

Die homologe *shp3a-shp3* genomische Region von *A. viteae* zeigt, wie bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* (vgl. auch Abb. 4-20) eine konservierte Syntanie (Nachbarschaft von Genen auf dem gleichen Chromosom) und enge Genkopplung (*shp3a* – *Intergen* – *shp3*). Anders als bei *L. sigmodontis* weisen die beiden paralogen Gene *shp3a* und *shp3* bei *A. viteae* eine divergente Orientierung auf.

#### 4.3.2 Vervollständigung der Sequenz des *shp3a-shp3*-Genomabschnitts von *A. viteae*

Insgesamt wurde ein genomischer *A. viteae*-Abschnitt von 11336 bp sequenziert, welcher die vollständige Sequenz zwischen den Genen *shp3a* und *shp3* sowie 1541 bp stromabwärts des *shp3a*-Stopp-Kodons und 1976 bp stromabwärts der TATA-Box von *Av-shp3* umfasst (Abb. 4-10). Zwischen dem sequenzierten Randbereich vom Phagenklon λAv3-1 und dem *Av-shp3a*-Gen befindet sich eine nicht sequenzierte Region von ca. 4.6 kb. Die Sequenz des Randbereiches von 945 bp enthält das erste Exon eines Gens mit signifikanter Homologie zum Gen *C29F5.1* aus *C. elegans*. Dieses Gen weist eine konvergente Orientierung zum *Av-shp3a*-Gen auf und eine parallele zum *Av-Intergen* und dem *shp3*-Promoter. Die Restriktionskarte mit der genomischen Organisation und den wichtigsten Phagenklonen ist in Abb. 4-10 dargestellt. Die vollständige Sequenz befindet sich im Anhang.



**Abbildung 4-10: Restriktionskarte und genomische Organisation des sequenzierten *Av-shp3a-shp3*-Abschnittes aus den Phagenklonen  $\lambda$ Av3-1,  $\lambda$ Av3-2,  $\lambda$ Av3-4 und  $\lambda$ Av3-5.**

Die Gene *shp3a* und *shp3* liegen in divergenter Orientierung eng gekoppelt im Genom mit einem Abstand von 5490 bp von TATA-Box zu TATA-Box (der hochkonservierte Promotor der *shp3a*- und *shp3*-Gene ist durch blaue Kästchen dargestellt). Ein Abschnitt von 11336 bp, der die Sequenz beider Gene, das erste Exon (gelber Pfeil) des *C29F5.1*-homologen Gens (*AvC29F5.1*), die intergenische Region (mit den potentiellen Exons 1 bis 7 des *Av-Intergens*; graue Pfeile) sowie 1541 bp stromabwärts des *shp3a*-Stopp-Kodons (bis zur Sequenzlücke) und 1418 bp stromabwärts der Sequenz mit Homologie zum 3'-nicht-kodierenden Bereich von *Ls-shp3* (weisser Pfeil) umfasst, wurde vollständig sequenziert. Ein Bereich von ca. 4.6 kb (mit einer Klammer gekennzeichnet) zwischen den ersten 945 bp und dem 3'-nicht-kodierenden Bereich von *Av-shp3a* wurde nicht sequenziert. Die Skizze wurde mit Hilfe des 'Clone Manager' Programms maßstabsgerecht dargestellt. Die *Mbol*-Restriktionsstellen, die dem 5'- bzw. 3'-Ende der inserierten *A. viteae*-Sequenz in den Phagenklonen  $\lambda$ Av3-1,  $\lambda$ Av3-2 und  $\lambda$ Av3-4 entsprechen, sind eingezeichnet. Spaltstellen für die Restriktionsenzyme *Eco*RI (E), *Hind*III (H), *Nsi*I (N) und *Pst*I (P) sind aufgeführt. Ausserdem sind die Primer Ov1 und Ov2, die bei der Isolierung der genomischen *Ov*-Sequenz verwendet wurden, mit ihrer Orientierung eingezeichnet.

### 4.3.3 Av-Intergen

#### 4.3.3.1 Transkription und Spleiss-Varianten

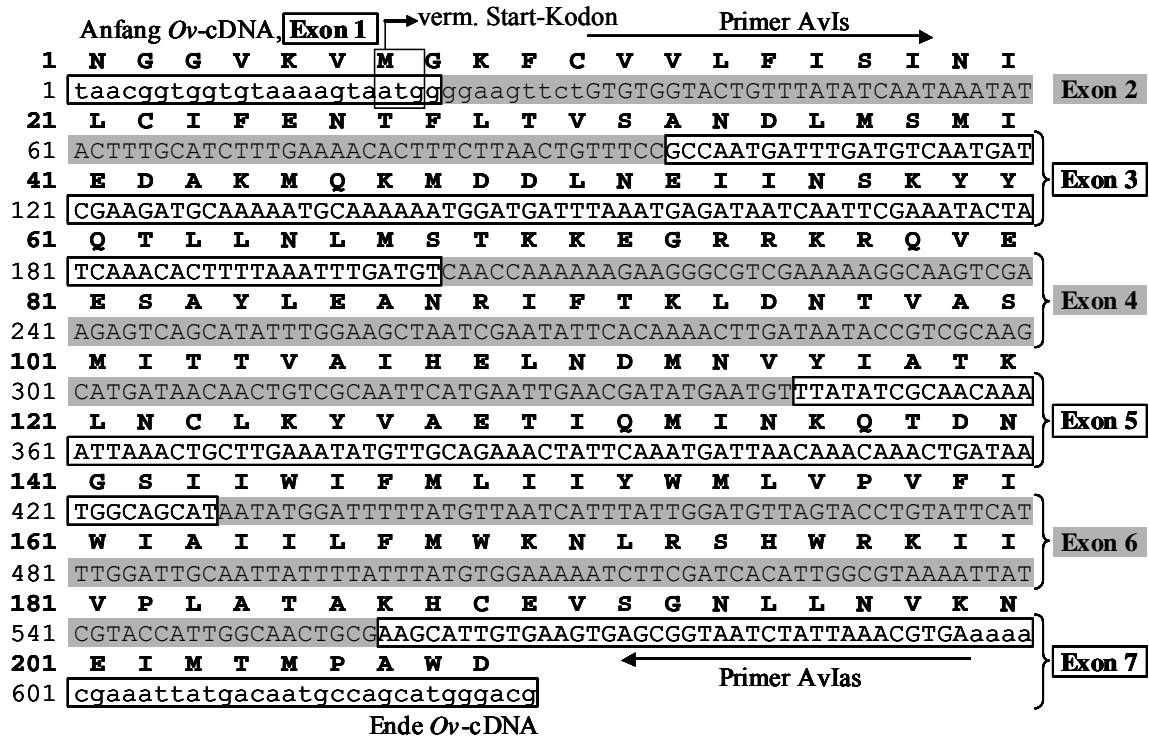
In der genomischen Region zwischen *Av-shp3a* und *-shp3* befinden sich sieben Abschnitte (Abb. 4-10) mit hoher Sequenz-Homologie (bis zu 95% Identität) zu *L. sigmodontis*, *B. malayi* und einem cDNA-Klon aus Männchen von *O. volvulus* (Kapitel 4.3.1). Wegen des erhöhten GC-Gehaltes (mit 33% über dem GC-Gehalt von *Brugia*-Introns) und der potentiellen Spleiss-Stellen, die in der Lage sind, diese sieben Segmente so miteinander zu verbinden, dass ein durchgehender Leseraster entsteht, wurde angenommen, dass diese sieben Abschnitte mehrere Exons eines weiteren Gens repräsentieren.

Mit einem Primer aus dem Exon 2 (AvIs, Sense-Orientierung) und einem aus dem Exon 7 (AvIas, Antisense-Orientierung) (vgl. Abb. 4-11) aus revers transkribierter *A. viteae*-Männchen-Gesamt-RNA konnte mittels PCR ein singuläres, 560 bp grosses cDNA-Fragment mit offenem Leseraster amplifiziert werden, dessen Sequenz der von der genomischen Sequenz abgeleiteten zu 100% entsprach (Abb. 4-11 und 4-12C). Da dieses Fragment nicht aus cDNA adulter *A. viteae*-Weibchen und -Blutmikrofilarien amplifiziert werden konnte, ist das *Intergen*-Transkript offenbar männchenspezifisch. Die schwache 1.7 kb Bande in der Weibchen-Spur (Abb. 4-12C) dürfte auf eine genomische Amplifikation zurückzuführen sein, vermutlich durch eine geringgradige Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA. Die Kontroll-PCR für vergleichbare cDNA-Mengen bei den drei verschiedenen Stadien erfolgte mit intronüberspannenden, Filarien-spezifischen Aktin-Primern (Bm-Aktin 5'/Bm-Aktin 3'; WAGNER 1998). Abb. 4-12B zeigt entsprechend der ubiquitären Expression von Aktin Amplifikationsprodukte in allen Stadien.

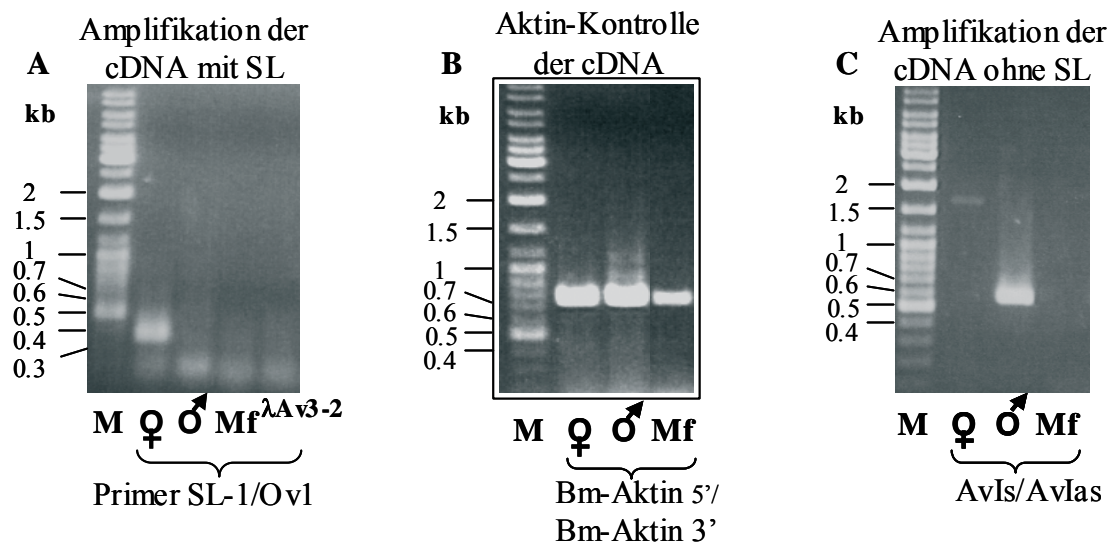
Das 5'-Ende und das 3'-Ende der *Av-Intergen*-cDNA wurden anhand der genomischen Sequenz und der starken Homologie zu der schon im Kapitel 4.3.1 beschriebenen *Ov*-Männchen-cDNA aus der Datenbank bestimmt (Sequenz in Abb. 4-11 durch Kleinbuchstaben dargestellt).

Unmittelbar nach dem vermutlichen 3'-Ende der *Av-Intergen*-cDNA folgt in der genomischen *Av*-Sequenz eine potentielle 5'-Spleiss-Stelle (GTTCGT), die auch in den genomischen Sequenzen von *L. sigmodontis* (GTTTGT) und *B. malayi* (GTTAGC) an dieser Position konserviert ist. Somit kann die Existenz eines weiteren Exons nicht ausgeschlossen werden, auch, weil 1240 bp stromabwärts dieser Spleiss-Stelle ein konservierter Bereich von ca. 80 bp

bei *A. viteae*, *B. malayi*, und *L. sigmodontis* (Identität bis zu 89%; grüne Boxen in Abb. 4-20) vorhanden ist.



**Abbildung 4-11:** Nukleotid-Sequenz (einschl. der abgeleiteten AS-Sequenz) der *Av-Intergen*-cDNA mit offenem Leseraster, die mit den spezifischen Primern *AvIs* und *AvIas* amplifiziert wurde und nur in adulten Männchen transkribiert wird. Das vermutliche Start-Kodon ist eingerahmt. Gerade Exone sind zur besseren Darstellung grau hinterlegt.

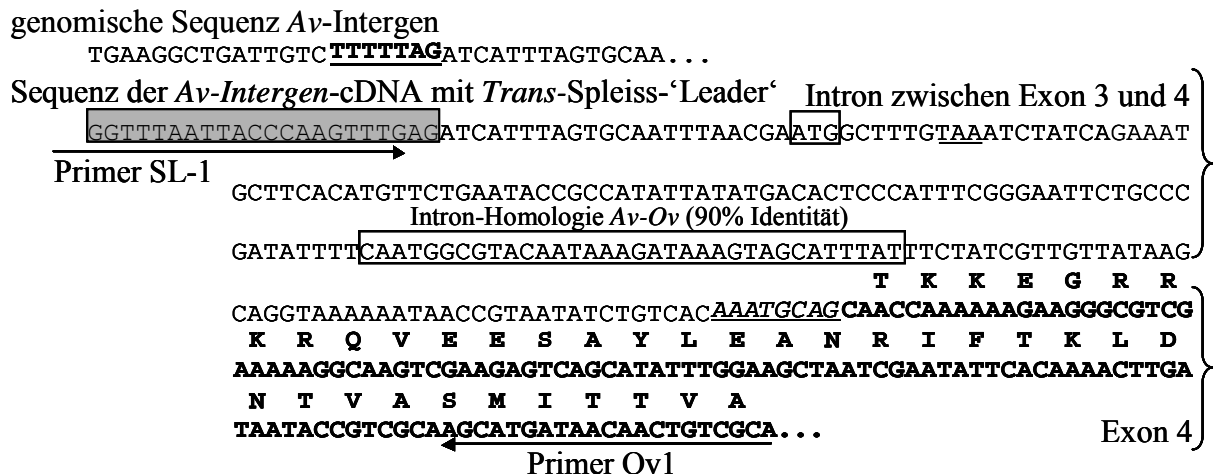


**Abbildung 4-12:** Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele (A, B, C) mit PCR-Amplifikationsprodukten zum Nachweis einer stadienspezifischen Transkription des *Av-Intergens*.

Als Matrice diente jeweils revers transkribierte Gesamt-RNA aus adulten weiblichen *A. viteae* (♀), adulten männlichen *A. viteae* (♂) und *Av*-Blutmikrofilarien (Mf). Unter der Klammer ist die entsprechende Primer-Kombination angegeben.

In Nematoden werden die Transkripte von 70-80% aller Gene durch eine *Trans*-Spleissreaktion prozessiert (NILSEN, 1995 und 1993; ZORIO et al., 1994), wobei eine identische 22 nt-SL-Sequenz am 5'-Ende der Transkripte angefügt wird. Welche biologische Bedeutung das *Trans*-Spleissen hat ist nicht bekannt.

Für das *Intergen* von *A. viteae* wurde bei Weibchen ein *trans*-gespleissstes Pseudotranskript gefunden (Abb. 4-12A). Eine PCR mit dem *Trans*-Spleiss-,Leader'-Primer SL-1 und dem spezifischen Antisense-Primer Ov1 aus dem Exon 4 führte zur Amplifikation eines ca. 340 bp-cDNA-Fragments (nur bei *Av*-Weibchen), dessen Nukleotidsequenz nach dem SL im Intron zwischen den Exonen 3 und 4 beginnt (an dieser Stelle ist auch ein *Trans*-Spleiss-Akzeptor vorhanden) und in Exon 4 einläuft (Abb. 4-13). Eine genomische Amplifikation konnte durch den Einsatz von Phagen-DNA aus dem Klon  $\lambda$ Av3-2 als Matrice ausgeschlossen werden (Abb. 4-12A).



**Abbildung 4-13: Sequenz der *Av*-*Intergen*-cDNA mit *Trans*-Spleiss-,Leader' (im grauen Kästchen), die mit den spezifischen Primern SL-1 und Ov1 (Pfeile) amplifiziert wurde und nur in adulten Weibchen transkribiert wird.**

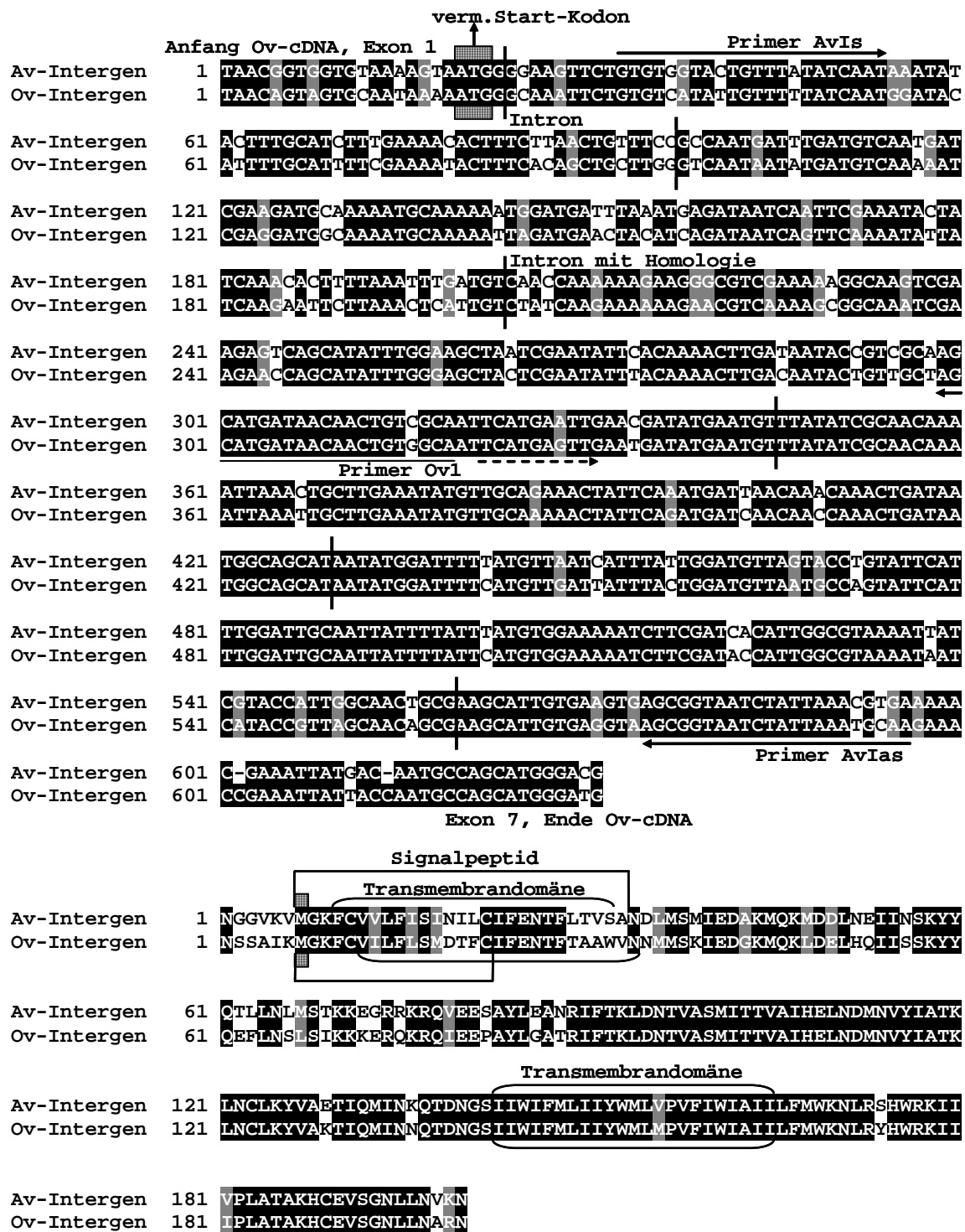
Über dem SL ist die genomische Sequenz mit dem *Trans*-Spleiss-Akzeptor dargestellt (unterstrichen). Nach dem potentiellen Start-Kodon (eingerahmt) folgen mehrere Stopp-Kodons, wobei der erste unterstrichen ist. Ein konservierter Bereich im Intron zwischen *A. viteae* und *O. volvulus* ist eingerahmt. Die Kodierregion von Exon 4 (mit der AS-Sequenz) ist fett dargestellt. Der potentielle *Cis*-Spleiss-Akzeptor ist unterstrichen.

#### 4.3.3.2 Homologie

Ein Vergleich der abgeleiteten *Av-Intergen*-cDNA mit offenem Leseraster und der *Ov*-cDNA aus der Datenbank (SWOvAMCAQ02E05SK) auf Nukleotid- und AS-Ebene ist in Abb. 4-14 dargestellt. Die Identität beträgt auf Nukleotid-Ebene 84% (516/611) und auf AS-Ebene 78% (156/200); die Homologie auf AS-Ebene ist 87% (175/200)].

Die abgeleiteten Polypeptide (*Av-Intergen* und *Ov-Intergen*) besitzen jeweils zwei potentielle Transmembrandomänen (TMNMM Server v. 2.0, CBS) und ein Signalpeptid [SignalV2.0, CBS, Vorhersage aufgrund ‚Neural Networks‘ (NN) und ‚Hidden Markov Models‘ (HMM)], wobei die vorhersagbare Schnittstelle der Signalpeptidase zwischen dem Cys<sup>16</sup> und dem Ile<sup>17</sup> liegt (Abb. 4-14). Bei der abgeleiteten AS-Sequenz von *Av-Intergen* ergab sich noch eine weitere mögliche Schnittstelle für die Signalpeptidase (laut Programm wahrscheinlicher) zwischen dem Ala<sup>27</sup> und dem Asn<sup>28</sup>. Bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *Av-Intergens* wurde darüber hinaus eine konservierte Nukleosid-Transporter-Domäne (Suchen nach konservierten Domänen in der ‚Pfam v7.5 - 4176 PSSMs‘-Datenbank, NCBI) und eine konservierten N-Glykosylierungsstelle (NGSI) gefunden. In der Abbildung 4-15 sind diese Domänen im Vergleich zum hENT2 (‚Human Equilibrative Nucleosid Transporter 2‘) dargestellt, der aus der Familie der Nukleosid-Transportern am besten charakterisiert ist.

In der Abb. 4-15 ist zusätzlich ein Homologievergleich der konservierten Nukleosid-Transporter-Domäne von *Av-Intergen* und einer Konsensus-Sequenz aus acht homologen Proteinen (u.a. auch aus *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* und einem hypothetischen Nukleosid-Transporter aus *C. elegans*) dargestellt.



**Abbildung 4-14: Homologievergleich der Intergen-cDNAs und der abgeleiteten AS-Sequenzen von *A. viteae* und *O. volvulus*.**

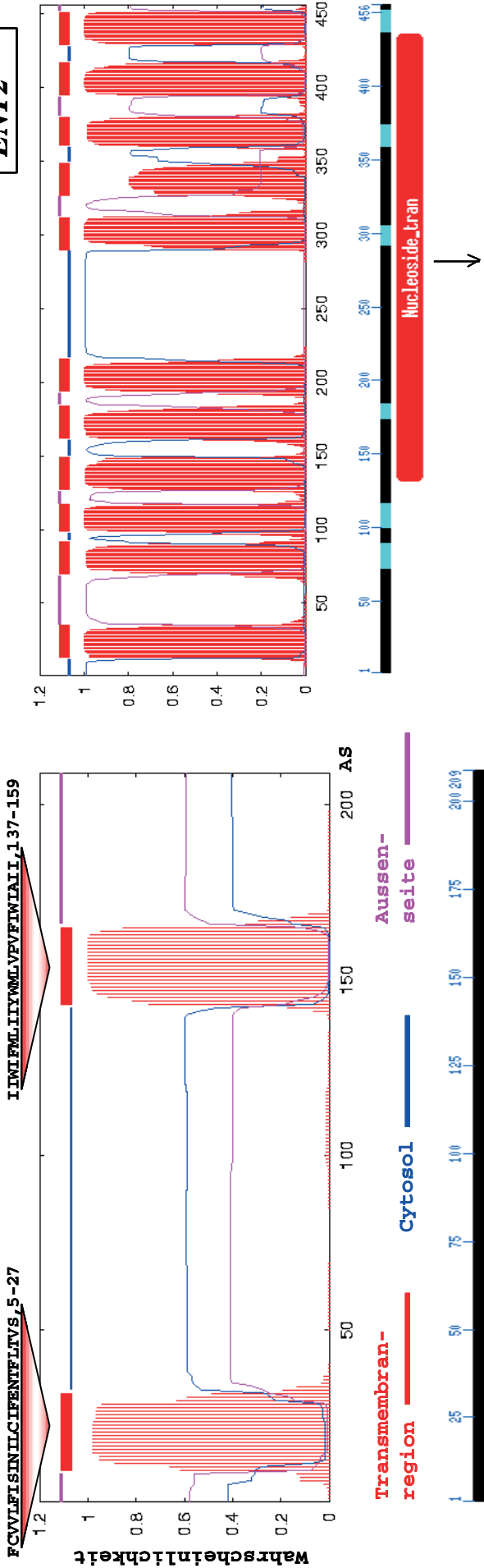
Der Anfang und das Ende der Sequenzen entsprechen dem 5'- bzw. 3'-Ende des Ov-cDNA-Klons SWOvAMCAQ02E05-5' aus der Datenbank. In der cDNA-Sequenz sind Intronpositionen durch vertikale Striche und die Primer Ov1, AvIs und AvIas durch Pfeile gekennzeichnet; das vermutliche Start-Kodon ist hervorgehoben. Ab dem Strichpfeil existiert keine genomische Sequenz bei *O. volvulus*, so dass die Exon/Intron -Grenzen bis zum Ende aufgrund der Homologie zu *A. viteae* bestimmt wurden. In der AS-Sequenz sind die potentiellen Transmembrandomänen und Signalpeptide hervorgehoben. Identische Nukleotide sind schwarz und ähnliche grau hinterlegt.



Av-Intergen

Computergestützte Vorhersage (TMNMM Server v. 2.0, CBS) von Transmembrandomänen

humaner ENT2



Konservierte Nukleosid-Transporter-Domäne

Av-Intergen	: 58	KYYQTLLNLMS	TKEGRRKRQVE	SAYL--E	ANRIFTKLDNTVA	SMITVAIH	LND	MNV	115	Sequenz-Vergleich der potentiellen
Konsensus	: 90	RYVLQKSEQE	TKELISDGE	ESGDEL	SGTFEPN	SEQL	ENQFKS	FFVTLTKFP	VLA	Nukleosid-Trans porter-Domäne von Av-Intergen mit der Nukleosid-Trans porter-Konsensussequenz aus acht homologen Proteinen, 40% Homologie (50/125).
Av-Intergen	: 116	YIATKLNCLK	YVAETIQ	MINKQTD	NGSI	IWI	FMLIIYWML	VPVF	IWIA	
Konsensus	: 150	VLIFTVTL	SVFPAPTAE	VYSSIAL	SLWSEQY	FMPVLC	FLFNLF	DLGRSL	AAWFM	
Av-Intergen	: 173	RSHWRK	KIIVPL							
Konsensus	: 210	DPRWLP	VLSIL							

Abbildung 4-15: Potentielle Transmembranregionen (oben) und konservierte Nukleosid-Transporter-Domäne (unten) in der Av-Intergen-Sequenz im Vergleich mit dem humanen Nukleosidtransporter hENT2.

In der computergestützten Vorhersage der Transmembranregionen sind die unterschiedlichen Lokalisationen farblich dargestellt, wobei auf der Abszissenachse die Aminosäuren (AS) und auf der Ordinatenchse die Wahrscheinlichkeit aufgetragen sind. Bei Av-Intergen ist zusätzlich die AS-Sequenz der Transmembrandomänen angegeben. Die Position der konservierten Nukleosid-Transporter-Domäne in der Av-Intergen-Sequenz ist mit einem roten Balken hervorgehoben. Zum Vergleich sind Transmembrandomänen und Nukleosid-Transporter-Domäne des humanen Nukleosidtransporters hENT2 dargestellt. Im Homologievergleich sind mit roter Farbe identische und mit blauer ähnliche AS gekennzeichnet. Eine potentielle Zielsequenz für N-Glykosylierung – NGS1 – ist unterstrichen. Zur Optimierung des Vergleiches wurden Sequenz-Lücken (---) eingefügt.

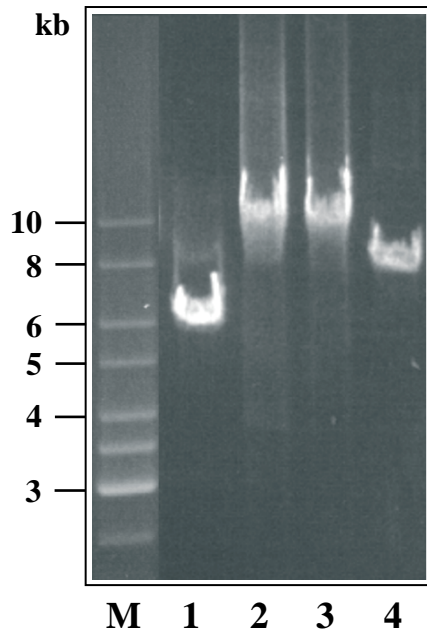
#### 4.4 Orthologe Gene bei *O. volvulus*

##### 4.4.1 OvC29F5.1

Die unterschiedliche genomische Organisation der *shp3a-shp3*-Region bei *A. viteae* - divergente Orientierung von *shp3a* und Deletion der Kodierregion von *shp3* - im Vergleich zu den Arten mit bescheideten Mikrofilarien *L. sigmodontis* und *B. malay* liessen die Frage nach der Existenz dieser Gene sowie deren Organisation bei weiteren Arten mit unbescheideten Mikrofilarien, wie der humanpathogenen Filarie *O. volvulus*, aufkommen. Die hohe Homologie von *O. volvulus*-cDNAs aus der Datenbank zu den *Av-shp3a* flankierenden Genen *AvC29F5.1* (Kapitel 4.2.2) und *Av-Intergen* (Kapitel 4.3.2.2) führte zu der Idee, mit zwei Primern aus diesen konservierten, flankierenden Bereichen und *Ov*-DNA eine ‚Long Range‘-PCR durchzuführen und so in Anlehnung an die konservierte Syntanie und enge Genkopplung bei *A. viteae* ein möglicherweise vorhandenes orthologes Gen *shp3a* bei *O. volvulus* zu identifizieren.

Beide Primer wurden aus identisch konservierten Sequenzen von *O. volvulus* und *A. viteae* gewählt. Der Sense-Primer Ov2 hybridisiert im Exon 1 von *AvC29F5.1* (Abb. 4-10, 4-17) und der Antisense-Primer Ov1 im Exon 4 des *Intergens* (Abb. 4-10, 4-13). Bei der ‚Long Range‘-PCR wurde genomische DNA aus *O. volvulus*, *A. viteae* und *L. sigmodontis* eingesetzt und als Kontrolle bei *A. viteae* zusätzlich auch Phagen-DNA des Klons Av3-1 verwendet (Abb. 4-16). Bei *O. volvulus* war das PCR-Amplifikat mit ca. 6.0 kb deutlich kleiner als bei *L. sigmodontis* (ca. 8.0 kb) und *A. viteae* (ca. 10 kb) (Abb. 4-16). Eine ‚Long Range‘-PCR mit diesen Primern und genomischer DNA aus *B. malayi* wurde zu einem späteren Zeitpunkt auch durchgeführt und ergab ein ähnlich grosses Fragment wie bei *L. sigmodontis* (ohne Abb.).

Das ca. 6.0 kb grosse Fragment von *O. volvulus* wurde von beiden Seiten mit den Primern Ov1 und Ov2 ansequenziert. Eine komplette Sequenzierung dieses PCR-Fragmentes gelang aber vorerst nicht, weil sowohl im 5‘- als auch im 3‘-Bereich Poly(A)-Sequenzen von bis zu 23 Adenin-Nukleotide nacheinander zu einem Abbruch der Direktsequenzierung führten. Um dieses Problem zu lösen wurde ein Amplifikat mit den Primern Ov5 (480 bp stromabwärts von Ov2) und Ov1 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten und eines der drei dabei entstandenen Spaltungsfragmente (ca. 3.0 kb) (vgl. Abb. 4-20) in einen ebenfalls mit *EcoRI* geschnittenen Plasmid-Vektor (pBSK) kloniert



**Abbildung 4-16: „Long Range“-PCR mit den Primern Ov1 (Antisense, hybridisiert im Exon 4 des *Intergens*) und Ov2 (Sense, hybridisiert im Exon 1 vom *C29F5.1*-homologen Gen)**

Spur M: Marker M1; Spur 1: genomische *Ov*-DNA als Matrize; Spur 2: genomische *Av*-DNA; Spur 3:  $\lambda$ Av3-1-DNA und Spur 4: genomische *Ls*-DNA.

Mit diesem rekombinanten Plasmid als Template konnte die Sequenzierung fortgesetzt werden und schliesslich gelang es, den gesamten Bereich zwischen den Primern Ov1 und Ov2 (6.0 kb) zu sequenzieren und analysieren. Am 5'-Ende konnte die genomische *Ov*-Sequenz aufgrund der vorhandenen *OvC29F5.1*-cDNAs in der Datenbank (Kapitel 4.2.2) und der Homologie zur genomischen Sequenz von *A. viteae* (91% Identität, 203/222 nt) um die 5'-Sequenz von Exon 1 unmittelbar nach dem SL bis zum Primer Ov2 erweitert werden. Abb. 4-17 zeigt die komplette cDNA mit der abgeleiteten AS-Sequenz. Die Sequenz des *C29F5.1*-Homologs von *B. malayi*, in der das Exon 2 und der Anfang von Exon 3 fehlen, wurde mit Hilfe der TIGR-Datenbankeinträge (Genomprojekt *B. malayi*) identifiziert (Abb. 4-18). Der N-Terminus ist bei *A. viteae*, *B. malayi* und *O. volvulus* identisch; die Identität zwischen *OvC29F5.1* und *C29F5.1* (beide Proteine vollständig) beträgt 69% (266/383 AS) und die Homologie ist 82% (318/383). Die Identität zwischen *O. volvulus* und *B. malayi* (ab dem Bereich, der von Exon 3 kodiert wird) ist 92% (255/275) und die Homologie insgesamt 96% (268/275). Die Funktion dieser Proteine ist nicht bekannt und es konnten auch keine funktionellen Domänen bei Datenbanksuchen identifiziert werden.

```

1 SL.....TTTGAGCTTGTGACATATAATCGTTCAAGGATTAAGACAAGCAAGCCTTCGGCCTTTAGG

Exon 1 1 M S A E G F W L F D G L E E E P Y G L L
61 TAATGTCAGCTGAAGGGTTTTGGTTATTTGATGGCTTGGAAGAGGAACCATATGGCCTTT
21 P L V N L S G K G G P T S T K F V E R I
121 TACCGCTTGTGAATTTATCTGGAAAAGGTGGACCAACATCCACGAAATTTGTGAAAAGAA
41 G S Y Q W Y L N D E T P T I I M P G M P
181 TTGGCTCATATCAATGGTATTTGAATGACGAAACACCCACCATCATTATGCCTGGAATGC
Ov2 →

61 L E S F Y W A G G K L Q Q D H G V I I Y
Exon 2 241 CTTTGAATCTTTCTACTGGGCAGGTGGCAAATTACAACAAGATCACCGGTGTGATTATAT
2 81 D V N H L K I P T G P L D T A I L A A H
301 ACGATGTTAATCACTTAAAAATTCCAACCTGGTCCCTTAGATACAGCCATATTAGCTGCAC
Ov5 →

101 Y T T T K A K K P I N F N D Y N F I T D
Exon 3 361 ATTATACAACAACAAAAGCGAAGAAACCAATTAATTTCAATGACTACAACCTTTATCACTG
121 A V N L Q K L F A F A Q E A G D G L F R
421 ATGCTGTAAACTTGCAAAAATTGTTTCGCATTTGCGCAGGAAGCTGGTGATGGATTGTTTC
141 I D A E R V G K T V L L T R M E A S D L
481 GAATTGATGCAGAACGAGTGGGGAAAACCGTTTTTATTAACGAGGATGGAAGCATCAGATC
161 M E I G H V T F D Q A L K R K M T K A R
Exon 4 541 TCATGGAAATTGGTCATGTAACATTTGATCAAGCACTAAAACGAAAAATGACGAAAGCGA
181 S K F T T G P F F Q L I S Y Q F G Q F K
601 GGTCAAAGTTCCTACTGTTCCATTTTCCAGCTCATTCTTATCAATTTGGCCAATTCA
201 L L V R F E V D C A D Y A A V K M Q S D
661 AACTACTGGTACGATTTCGAAGTTGATTGCGCTGATTATGCTGCTGTGAAAATGCAAAGCG
221 N H L E K E G E S E P K K E K F N E N N
721 ACAACCATTGAGAGAAAGAGGCGAGTCGGAACCAAAAAAGAGAGTTCAATGAAAAATA

241 V I S Y M E F G E V P R N I P L Q L L T
Exon 5 781 ATGTAATTTTCAATATGGAATTCGGTGAAGTTCCACGGAATATTCCGTTACAACCTGTTGA
5 261 T Y P Q G A G F P F F T W A Q M F F T A
841 CAACTTATCCACAAGGTGCTGGATTTCATTCTTCACATGGGCACAAATGTTTTTCACTG
281 A D Q E I V G W F K G N G D F G K P A L
901 CCGCAGATCAGGAGATTGTCTGGCTGGTTCAAAGGAAATGGCGATTTTGGAAAACAGCAC
301 N A L S D I S K L I K P L P Y V V L S K
Exon 6 961 TGAACGCTCTATCGACATTTCTAAACTAATTAACCATTGCCCTATGTGGTACTGTCAA
321 V H D C L D K I A K F L I K N D P E F K
1021 AAGTTCATGACTGCTTAGATAAAATTGCAAAATCTTGATAAAAAATGATCCTGAATTTA
341 C A L I W K G K N H L E I F A K T S T T
1081 AATGTGCTTTGATATGGAAAGGCAAAATCATCTAGAAATTTTGTAAAACGAGTACCA
361 G A V S P G V K E L M K T Q C K E L D E
1141 CTGGGGCTGTTTCACCTGGAGTAAAGAATTGATGAAGACACAATGCAAAGAAGTGGATG
381 S E E *
1201 AATCAGAAGAA TGA

```

**Abbildung 4-17: *OvC29F5.1*-cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz.**

Die letzten sechs Nukleotide des *Trans*-Splice-, Leaders' (SL), sowie das Start- und Stopp-Kodon sind grau hinterlegt. Die AS-Sequenz ist mit fetter Schrift über der Nukleotid-Sequenz eingezeichnet. Die Exons 1, 3 und 5 sind zur besseren Darstellung fett hervorgehoben. Die Primer Ov2 und Ov5 sind mit Pfeilen gekennzeichnet; eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle ist umrandet. Alle in der Datenbank vorliegenden cDNAs enden vor einer internen Adeninreichen Sequenz (doppelt unterstrichen). Die restliche cDNA-Sequenz wurde aus der genomischen Sequenz und aufgrund der Homologie zu *C. elegans* abgeleitet. Die Längen der entsprechenden Introns können aus der Abbildung 4-20 entnommen werden.

			<b>Exon 1</b>	
AvC29F5.1	1	MSAEGFWLFDGLEEEEPYGLLPLVNL	SGKGGPTSTKFVERIGSYQWYLND	ETPTIV-----
BmC29F5.1	1	MSAEGFWLFDGLEEEEPYGLLPLVNL	SGKGGPTSTKFVERIGSYQWYLND	ETPTIV-----
OvC29F5.1	1	MSAEGFWLFDGLEEEEPYGLLPLVNL	SGKGGPTSTKFVERIGSYQWYLND	ETPTIIMPCMP
C29F5.1	1	MSADGFWLFEGLLEEEEPYGLLPLN	NLSGKGGPTSTKYVDRIGSYQWYLND	ETATILVPGAP
			<b>Exon 2</b>	<b>Exon 3</b>
BmC29F5.1	56	-----	-----	PINFNEYNFITD
OvC29F5.1	61	LESFYWAGGKLQODHGVIIYDVNHLK	IPTGPLDTAIIAAHYTTTKAKKP	INFENDYNFITD
C29F5.1	61	VESFYWPGGKLQODHGVIIYDVNHLK	VREGSLDAIIIAARLLSEKKKKP	IDFSQHFITD
			<b>Exon 4</b>	
BmC29F5.1	68	AVNLQKLFAFAQEAGDGLFRIDV	ERIGKTVLLTRMEASDLMEIGHVT	FDQALKRKMTKAR
OvC29F5.1	121	AVNLQKLFAFAQEAGDGLFRIDA	ERVGKTVLLTRMEASDLMEIGHVT	FDQALKRKMTKAR
C29F5.1	121	AINLQKIFAFANEAGEGLFRIDC	ERVGKTVLLTRMEASDLMEIGHVT	DQNLKHRMTFR
BmC29F5.1	128	SKFTTGPPFFQLVSYHFGKFKLLVR	FEVDCADYASVEMQNDNHLEKEGE	LEPKKKRFNENN
OvC29F5.1	181	SKFTTGPPFFQLISYQFGQFKLLVR	FEVDCADYAAVKMQSDNHLEKEGE	SEPKKRFNENN
C29F5.1	181	GAHSTGPPFFQLVSYQVGFRIILVR	FEVDCADYAAVKATP-VPVVK-SE	VLEPKKKSMDNP
BmC29F5.1	188	AISYMEYGEVPRNIALQLLT	TYPOGAGFPFFTTWAQMFFTAADQ	EIVGWFKGNGDFGKPA
OvC29F5.1	241	VISYMEYGEVPRNIPLQLLT	TYPOGAGFPFFTTWAQMFFTAADQ	EIVGWFKGNGDFGKPA
C29F5.1	239	DIEVNVYGEVPHDVPLOVL	TTYPQGAGFPFFTTWAQLFFT	NANHELLGWFKGNGDFGKPA
BmC29F5.1	248	NALSDISKLIKPLPYVVL	SKVHDCLDKIAKFLIKNDPEFKCS	LIWKGNHLEIFAK-TST
OvC29F5.1	301	NALSDISKLIKPLPYVVL	SKVHDCLDKIAKFLIKNDPEFKC	ALIWKGNHLEIFAK-TST
C29F5.1	299	YTLQDVSKMMKPLPLVSL	CKVHDCLDKVYKFLTKNDDNFR	CGLVWKGAHLEIFAKHEEA
BmC29F5.1	307	TGAVSPGVKELIKTQCKE	PDELEE--	
OvC29F5.1	360	TGAVSPGVKELMKTQCKE	LDESEE--	
C29F5.1	359	TGGISKGVRDFLATQCKD	-DEPEEQK	

**Abbildung 4-18: Homologievergleich von C29F5.1 aus *C. elegans* und der abgeleiteten AS-Sequenzen von OvC29F5.1, BmC29F5.1 (unvollständig) und dem ersten Exon von AvC29F5.1.**

Die Pfeile geben die Position und Reihenfolge der für die AS-Sequenz kodierenden Exons und sollen einen Überblick über die fehlenden Bereiche bei *A. viteae* und *B. malayi* schaffen. Identische AS sind schwarz und ähnliche grau hinterlegt.

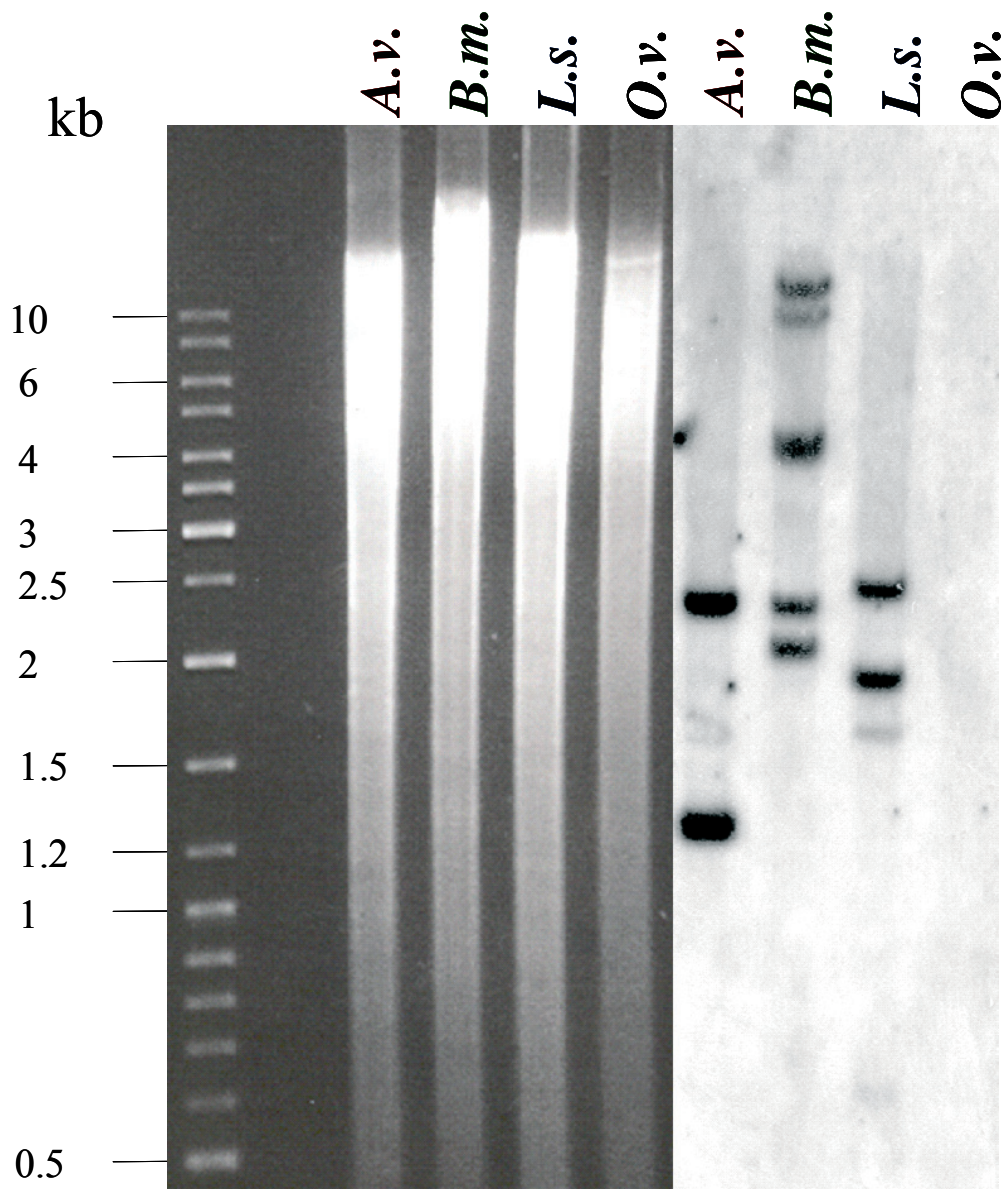
#### 4.4.2 Organisation des ‚intergenischen‘ Abschnitts

Anhand der Sequenzierung des 3'-Bereiches des 6.0 kb grossen genomischen *Ov*-Fragments (Kapitel 4.4.1) konnten die aus der Datenbank bekannte Sequenz der *Ov-Intergen*-cDNA (Abb. 4-14) bis zum Primer Ov1 im Exon 4 verifiziert und die Exon/Intron-Grenzen identifiziert werden (Abb. 4-20). Die hohe Homologie zwischen *O. volvulus* und *A. viteae* setzt sich noch um 126 bp stromaufwärts des 5'-Endes der *Ov-Intergen*-cDNA fort (Identität 77%, 125/161 nt) (Abb. 4-20).

Anhand der *Ov-Intergen*-cDNA und der Homologie zu *A. viteae* kann die klonierte genomische *Ov*-Sequenz um die verbleibenden 26 nt des Exons 4 der *Intergen*-cDNA erweitert werden. Damit ergibt sich für *O. volvulus* eine zusammenhängende genomische Sequenz von 6098 bp, vom ersten Exon des *OvC29F5.1*-Gens bis zum vierten Exon des *Intergens*.

#### 4.4.3 ‚shp3a‘

Die durchgeführte Analyse der genomischen *O. volvulus*-Sequenz ergab, dass das *shp3a*-Gen zwischen den hoch konservierten Genen *C29F5.1*-Homolog und *Intergen* fehlt (Abb. 4-20). Damit war nicht ausgeschlossen, dass ein möglicherweise vorhandenes *shp3a*-Gen abweichend von den anderen untersuchten Arten *A. viteae*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* an anderer Stelle in Genom vorkommt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurde eine genomische Southern Blot-Analyse mit der *Av-shp3*-Promotorsonde durchgeführt. Die Promotorsequenz ist bei allen *shp3a*- und *shp3*-Genen hoch konserviert (Abb. 4-5) und erschien daher als geeignetes Werkzeug. Von jeder Spezies wurden 5 µg DNA mit *EcoRI* gespalten, in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und der Southern Blot mit der 270 bp grossen *Av-shp3*-Sonde (vgl. auch Kapitel 4.2.3) unter wenig stringenten Bedingungen (0.4xSSC, 50°C) hybridisiert (Abb. 4-19).



**Abbildung 4-19: Southern Blot-Analyse von DNA aus *A. viteae* (A.v.), *B. malayi* (B.m.), *L. sigmodontis* (L.s.) und *O. volvulus* (O.v.) mit der Sonde aus der *Av-shp3*-Promoterregion.**

Je 5 µg DNA aus den verschiedenen Filarien wurden mit *Eco*RI gespalten und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. **Links:** Ethidiumbromid-Färbung mit Molekulargewichtsstandard M1. **Rechts:** Chemoluminiszenznachweis der Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten *shp3*-Promoter-Sonde (Sequenz von Av-Pro5 bis T3 aus dem Phagenklon λAv3-2, Abb. 4-5, 270 bp) unter wenig stringenten Bedingungen (50°C, 0.4xSSC).

Die zwei Signale bei *A. viteae* in der Abb. 4-19 entsprechen den in früheren Experimenten gefundenen und analysierten Fragmenten mit der *shp3*-Promotor-Sequenz (Abb. 4-6). Dass hier im Unterschied zu den Ergebnissen im Kapitel 4.2.3 (Abb. 4-6) beide Signale mit gleicher Intensität auftreten, erklärt sich mit der niedrigen Stringenz beim vorliegenden Experiment. Die zwei Banden in der Spur mit *L. sigmodontis*-DNA (Abb. 4-19), die eine

stärkere Hybridisierung aufweisen, entsprechen den genomischen *EcoRI*-Fragmenten von *L. sigmodontis* (2535 bp, 2-2536 in der genomischen Sequenz bzw. 1882 bp, 5860-7741; Abb. 4-20). In dieser Spur treten auch zwei Banden (ca. 600 und 1600 bp gross) auf, die mit der *Av-shp3*-Promotorsonde schwach kreuzhybridisieren. Hier handelt es sich vermutlich um eine Kreuzhybridisierung der Sonde mit ähnlichen Bereichen in der *Ls*-DNA aufgrund der niedrigen Stringenz-Bedingungen. Bei *B. malayi* entspricht die bei etwa 4.0 kb auftretende, hybridisierende Bande dem genomischen *EcoRI*-Fragment (4125 bp, 5942-10066). Das Vorhandensein von insgesamt fünf Signalen von vergleichbarer Intensität in dieser Spur war allerdings überraschend. Hier könnte möglicherweise eine nur partielle Spaltung der genomischen DNA die Ursache sein.

Die *Av-shp3*-Promotorsonde hybridisierte unter diesen wenig stringenten Bedingungen dagegen nicht mit Fragmenten von *O. volvulus*. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die Gene *shp3a* und *shp3* bei *O. volvulus* nicht vorhanden sind. Zur Überprüfung der *Ov*-DNA wurde der Southern Blot mit einer genomischen *shp1*-Sonde von *O. volvulus* rehybridisiert, wobei ein deutliches Signal zu sehen war (ohne Abbildung).

#### **4.5 Homologievergleiche zwischen den verschiedenen Spezies (*B. malayi*, *L. sigmodontis*, *A. viteae* und *O. volvulus*)**

Die Amplifikation der genomischen *O. volvulus*-Sequenz mit Oligonukleotiden aus den hoch konservierten, flankierenden Genen *OvC29F5.1* und *Ov-Intergen* resultierte zwar in der Isolierung der flankierenden Gene, aber die dazwischen liegende Sequenz enthielt abweichend von *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *A. viteae* kein orthologes *shp3a*-Gen (Abb. 4-20).

Durch die Analyse der kompletten genomischen Sequenz von *A. viteae* wurden hohe Homologien zwischen den 5'- und 3'-flankierenden, nicht kodierenden Bereichen des *Av-shp3a*-Gens identifiziert (Abb. 4-20), die eine Inversion, d.h. eine Chromosomenveränderung, bei der ein Abschnitt relativ zu den flankierenden Bereichen gedreht und invers wieder eingebaut wird, dieses Genes vermuten lassen.



# *C29F5.1-homologes Gen*

*shp3a*

*Intergen*

*shp3*

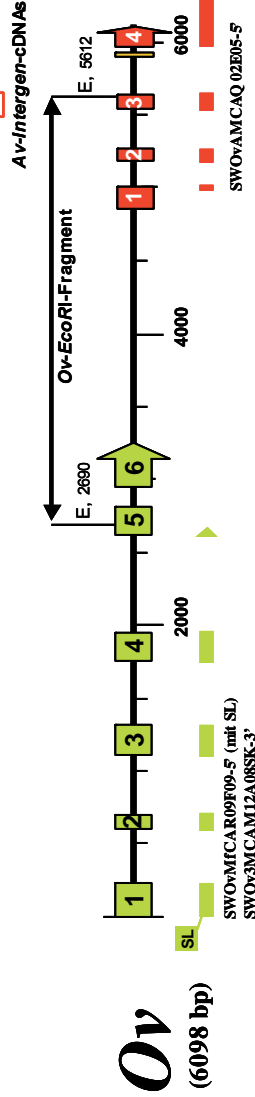
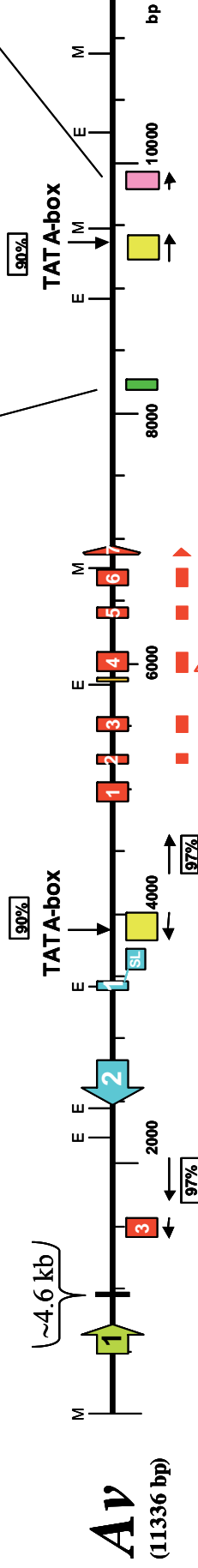
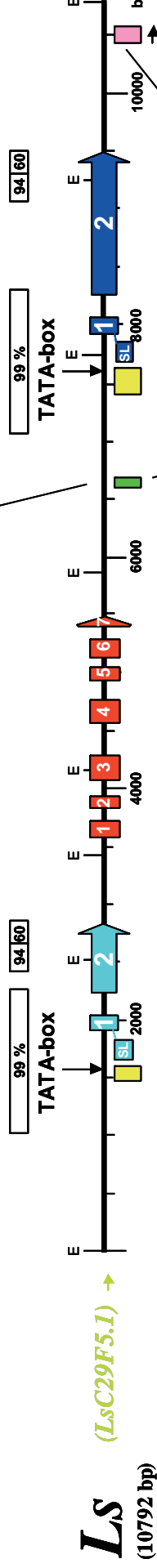
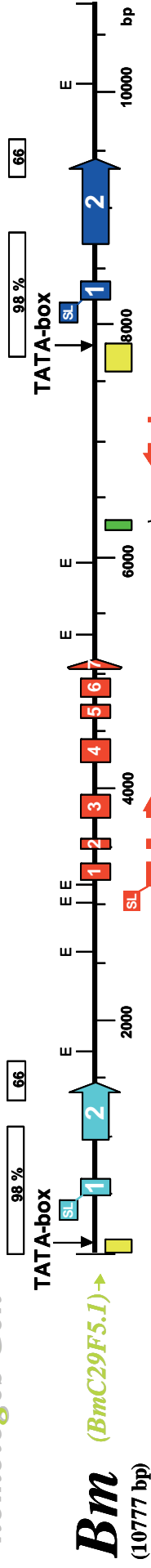


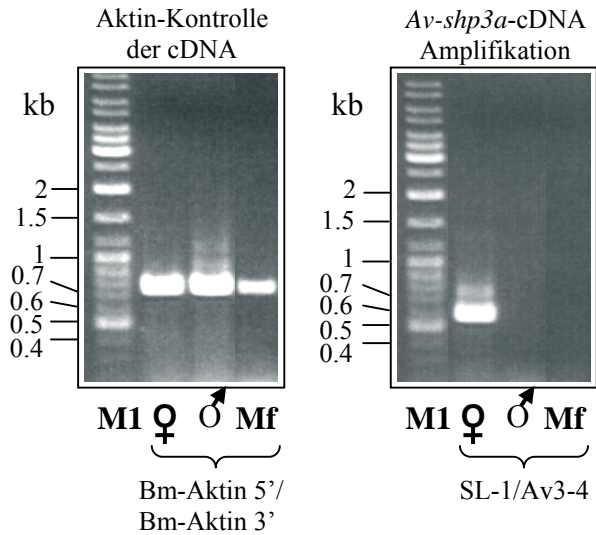
Abbildung 4-20: Homologievergleich der orthologen genomischen Regionen von *B. malayi*, *L. sigmodontis*, *A. viteae* und *O. volvulus*.

Die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* (E) und bei *A.v.* zusätzlich *MboI* (M); entsprechen dem 5'- bzw. 3'-Ende der inserierten *A. viteae*-Sequenz in den Phagenklonen λAv3-1, -2 und -4) sind eingezeichnet. Die Position und die Orientierung des *C29F5.1*-homologen Gens bei *B. m.* und *L.s.*, die durch „Long Range“-PCR verifiziert sind, sind angedeutet. Die Exons der entsprechenden Gene sind in den Restriktionskarten mit farbigen Boxen eingezeichnet, wobei das letzte Exon als Pfeil die Orientierung anzeigt: hellblau für *shp3a*, dunkelblau für *shp3*, rot für *Intergen* und hellgrün für das *C29F5.1*-homologe Gen. Die farbigen Pfeile unter den Restriktionskarten repräsentieren die entsprechenden cDNAs. Die mit einer Linie verbundenen grünen und rosafarbenen Kästchen stellen zusätzliche homologe Sequenzen dar (Kapitel 4.3.2.1 und Abb. 4-7). Die gelben Kästchen repräsentieren die hochkonservierte *shp3a/shp3*-Promotorregion. Kleine, schwarze Strichpfeile unter den Boxen deuten die Orientierung der entsprechenden Sequenzen an. Die Position der potentiellen TATA-Boxen, der *Trans*-Splice-Akzeptorstellen (SL), der Sequenzlücke (~4.6 kb) in der *Av*-Sequenz und des klonierten *EcoRI*-Fragments in der *Ov*-Sequenz sind angegeben. Ferner wurde für *L.s.*, *B.m.* und *A.v.* ein Vergleich der paralogen Gene *shp3a* und *shp3* einschliesslich flankierender Sequenzen durchgeföhrt und die homologen bis identischen Bereiche (in % angegeben) als schwarze Kästchen über bzw. unter der Restriktionskarte eingezeichnet.

#### 4.6 Transkription des *Av-shp3a*-Gens in Parasitenstadien

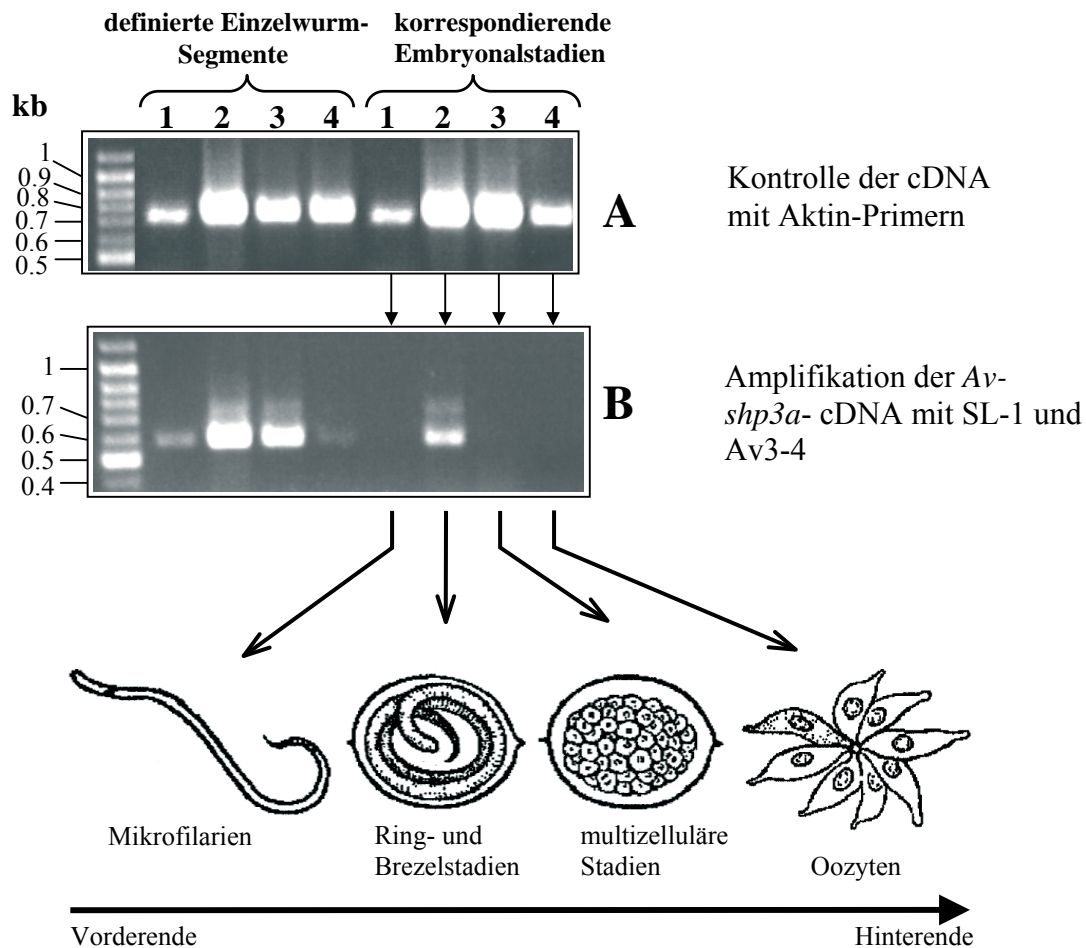
Die Proteine Shp3/3a der Mikrofilarienscheide von *L. sigmodontis* und *B. malayi* werden ausnahmslos in weiblichen Würmern transkribiert und exprimiert (HIRZMANN et al., 2002). In der Folge wurde auch für *Av-shp3a* überprüft, ob das Gen stadienabhängig transkribiert wird. Dafür wurde eine PCR mit dem *Trans*-Spleiss-Primer SL-1 und dem *Av-shp3a*-spezifischen, intronüberspannenden Primer Av3-4 (Abb. 4-2) durchgeführt. Als Matrize diente revers transkribierte *A. viteae*-Gesamt-RNA aus adulten Weibchen, Männchen und Blutmikrofilarien. Das spezifische Fragment von 580 bp konnte nur aus *Av*-Weibchen-cDNA amplifiziert werden (Abb. 4-21). Eine genomische Amplifikation konnte durch den Einsatz des *Trans*-Spleiss-, Leader'-Primers und des intronüberspannenden Primers Av3-4 ausgeschlossen werden. Als Kontrollreaktion mit den gleichen Mengen an Templates wurde eine PCR mit Filarien-spezifischen Aktin-Primern durchgeführt (WAGNER, 1998). Abb. 4-21 zeigt entsprechend der ubiquitären Expression von Aktin Amplifikationsprodukte in allen Stadien.

Zur genaueren Lokalisierung der weibchenspezifischen Transkription wurden definierte Einzelwurm-Segmente und die mit den Segmenten korrespondierenden Embryonalstadien untersucht (vgl. Kapitel 3.2.3 und Abb. 3-1). Aus diesen definierten Einzelwurmsegmenten und den korrespondierenden Embryonalstadien wurde RNA isoliert und cDNA hergestellt, die als Matrize für PCR-Amplifikationen mit den gleichen Primern wie für den Nachweis der stadienspezifischen Transkription eingesetzt worden war. Dabei konnte eine abundante *Av-shp3a*-Transkription im Segment mit Ring- und Brezelstadien (Segment 2) nachgewiesen werden (Abb. 4-22B). Die Transkription war deutlich schwächer im Segment 3 und fand in den Segmenten 1 und 4 allenfalls auf niedrigem Niveau statt. Die Kontrollreaktion über Aktin-Primer zeigt, dass zumindest in den Segmenten 3 und 4 ähnliche cDNA-Mengen verwendet worden waren (Abb. 4-22A). Bei den korrespondierenden Embryonalstadien war *shp3a*-Transkript nur in Ring- und Brezelstadien nachweisbar (Abb. 4-22B), d.h. in den für Segment 2 charakteristischen Stadien. Bei gleichen Mengen an Gesamt-cDNA war in den Wurmsegmenten deutlich mehr *shp3a*-Transkript zu finden als in den Embryonen allein.



**Abbildung 4-21: Nachweis einer stadienspezifischen Transkription des *Av-shp3a*-Gens bei *A. viteae*.**

Zu diesem Zweck wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA adulter *A. viteae*-Weibchen und -Männchen, sowie aus Mikrofilarien cDNA hergestellt. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem *Trans*-Spleiss-Primer SL1 und dem spezifischen, intronüberspannenden Primer Av3-4 (584 bp grosses Fragment). Als Kontrolle diente die Amplifikation der beta-Aktin-cDNA (750 bp-Fragment) von *A. viteae* mit Filarien-spezifischen Primern (WAGNER, 1998). Dargestellt sind Photos der ethidiumbromidgefärbten Agarosegele mit Molekulargewichtsstandard M1.



**Abbildung 4-22: Transkriptionsprofil von *Av-shp3a* in definierten Einzelwurm-Segmenten adulter *A. viteae*-Weibchen und den korrespondierenden Embryonalstadien.**

Aus Gesamt-RNA definierter Einzelwurm-Segmente und den korrespondierenden Embryonalstadien (vgl. Kapitel 3.2.3 und Abb. 3-1) wurde mittels RT-PCR cDNA hergestellt, und diese als Matrize für die nachfolgenden PCR-Amplifikationen mit spezifischen, intronüberspannenden Primern verwendet (vgl. Abb. 4-21). Zur Übersicht sind die entsprechenden Embryonalstadien der definierten Wurmsegmente unter den Gelphotos schematisch dargestellt.

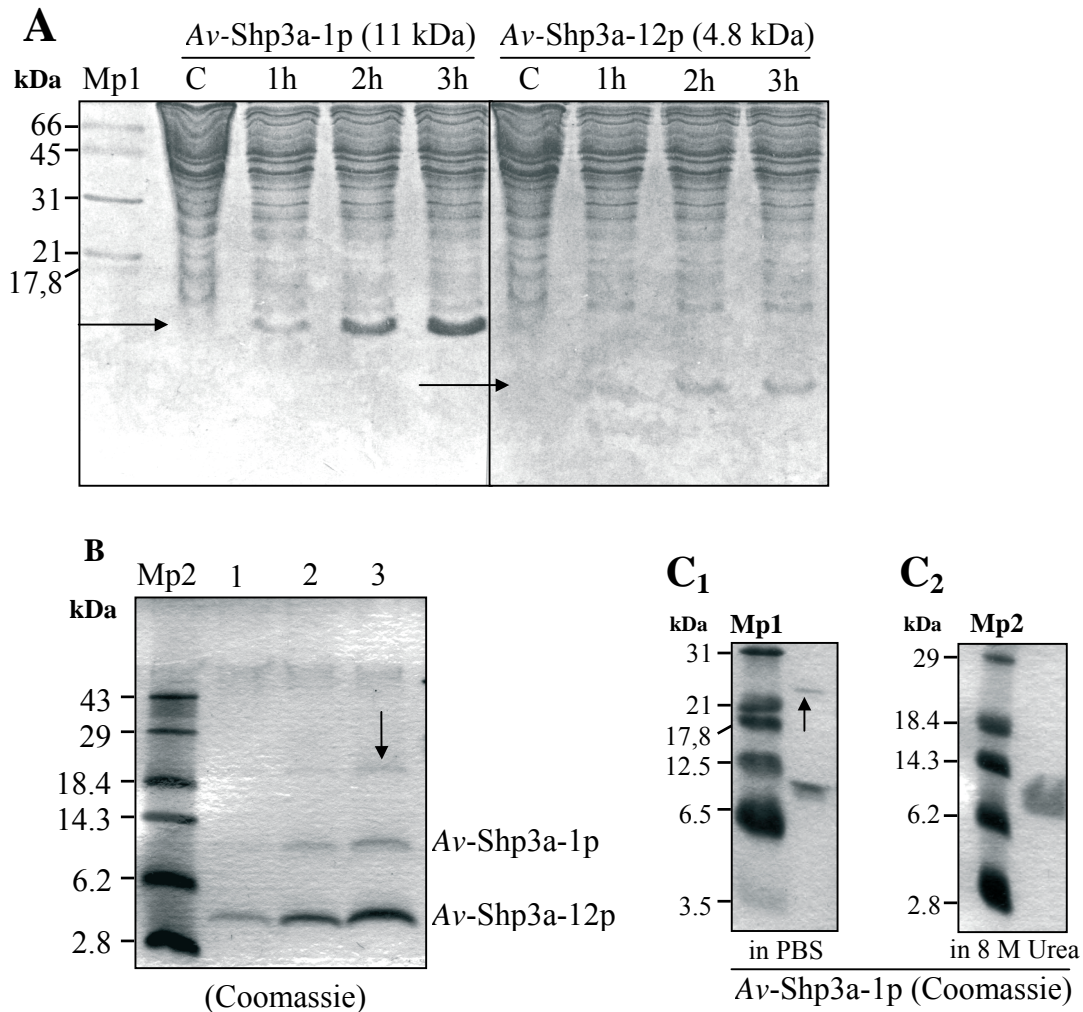
## 4.7 Expression von Av-Shp3a-Peptiden und weitergehende Charakterisierung des Moleküls

### 4.7.1 Herstellung rekombinanter Av-Shp3a-Peptide und entsprechender Antisera

Für die Charakterisierung der Av-Shp3a-Protein-Expression in den verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten bedurfte es eines spezifischen Antiserums gegen das Protein. Zu seiner Herstellung wurden rekombinante Antigene aus Teilsequenzen von Av-Shp3a herangezogen.

Bei der Auswahl der Peptide waren der hohe Serin/Threonin-Anteil und das damit möglicherweise verbundene grosse Ausmass an posttranslationalen Modifikationen zu berücksichtigen, wie dies bei dem orthologen Gen von *L. sigmodontis* gezeigt werden konnte (vgl. HINTZ, 1995; HINTZ et al., 1996). Deshalb sollte für die Herstellung eines Antiserums der nicht-modifizierte C-Terminus des Proteins, der bei den bisher untersuchten Filarienarten (HIRZMANN et al., 2002) und *A. viteae* ein hoch konserviertes Tryptophan-reiches Motiv (WWCWW) enthält, rekombinant exprimiert werden. Die AS-Sequenz eines grösseren Peptids Av-Shp3a-1p (errechnetes Molekulargewicht von 11.1 kDa), das einen Teil des Ser/Thr-Bereiches enthält, ist in Abb. 4-2 grau hinterlegt (AS 56 bis 133), die eines kleineren Peptids Av-Shp3a-12p (4.8 kDa), das die C-terminale Region (AS 109-133) mit dem konservierten Tryptophan-Motiv (WWCWW) enthält, ist zusätzlich schwarz unterstrichen. Die Proteine wurden als 6xHis-Proteine exprimiert.

In Abb. 4-23A ist der Zeitverlauf der Proteinexpression von zwei ausgewählten Klonen unter Verwendung des Qiagen-Expressionssystems nach Induktion dargestellt. Nach präparativer Reinigung über eine Ni-NTA-Agarosesäule wurden beide Peptide gegen PBS dialysiert. Beide Polypeptide waren in PBS unlöslich und fielen während der Dialyse aus. Dieses Ausfallen liess sich auch nicht dadurch verhindern, dass der Dialysepuffer (anfangs 8 M Harnstoff in 1x PBS) nur stufenweise durch 1x PBS ersetzt wurde. Abb. 4-23B zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE der rekombinanten Proteine bei Verwendung eines Peptidgeles, wobei die Konzentrationsbestimmung gemäss Kapitel 3.8.1 erfolgte. Nach der Dialyse trat eine weitere Proteinbande ( $M_r$  von 22 kDa) in der Coomassie-Färbung auf, die im nicht dialysierten 8 M Harnstoff-Eluat nicht vorhanden war.



**Abbildung 4-23: Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine Av-Shp3a-1p und Av-Shp3a-12p.**

**IA:** Zeitverlauf der Proteinexpression der rekombinanten 6xHis-Proteine Av-Shp3a-1p (MW 11 kDa) und -12p (MW 4.8 kDa) unter Verwendung des Qiagen-Expressionssystems. Die Expression der 6xHis-Proteine in den Bakterien *E. coli* M15, die mit den rekombinanten Plasmiden pQE-30-1p und -12p transformiert worden waren, wurde mit 1 mM IPTG für insgesamt 3 h bei 37°C induziert. In der Spur „C“ ist die nicht induzierte Kontrolle aufgetragen. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots der Kulturen entnommen und nach Lyse der Bakterien in 8 M Harnstoff (denaturierende Bedingungen) wurden die Proteine in einem 20%igen SDS-PAGE-Gel nach OKAJIMA et al. (1993) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die rekombinanten Proteine, deren Mengen mit der Zeit zunimmt, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. **B:** SDS-Page-Analyse der beiden vereinigten rekombinanten Proteine nach präparativer Reinigung über eine Ni-NTA-Agarosesäule und Dialyse gegen PBS (16.5% Tris-Tricin-Gel; reduzierende Bedingungen). Mp2: Peptidmarker; Auftragsmengen: 0.1/0.2 µg (Spur 1), 0.3/0.6 µg (Spur 2) und 0.5/1 µg (Spur 3) von Av-Shp3a-1p/Av-Shp3a-12. Die Proteinbande bei 22 kDa (Pfeil) entspricht einem Dimer des grösseren rekombinanten Proteins (Av-Shp3a-1p), wie die SDS-PAGE (20%iges Gel) in PBS (C<sub>1</sub>) und in 8 M Harnstoff (C<sub>2</sub>) zeigt.

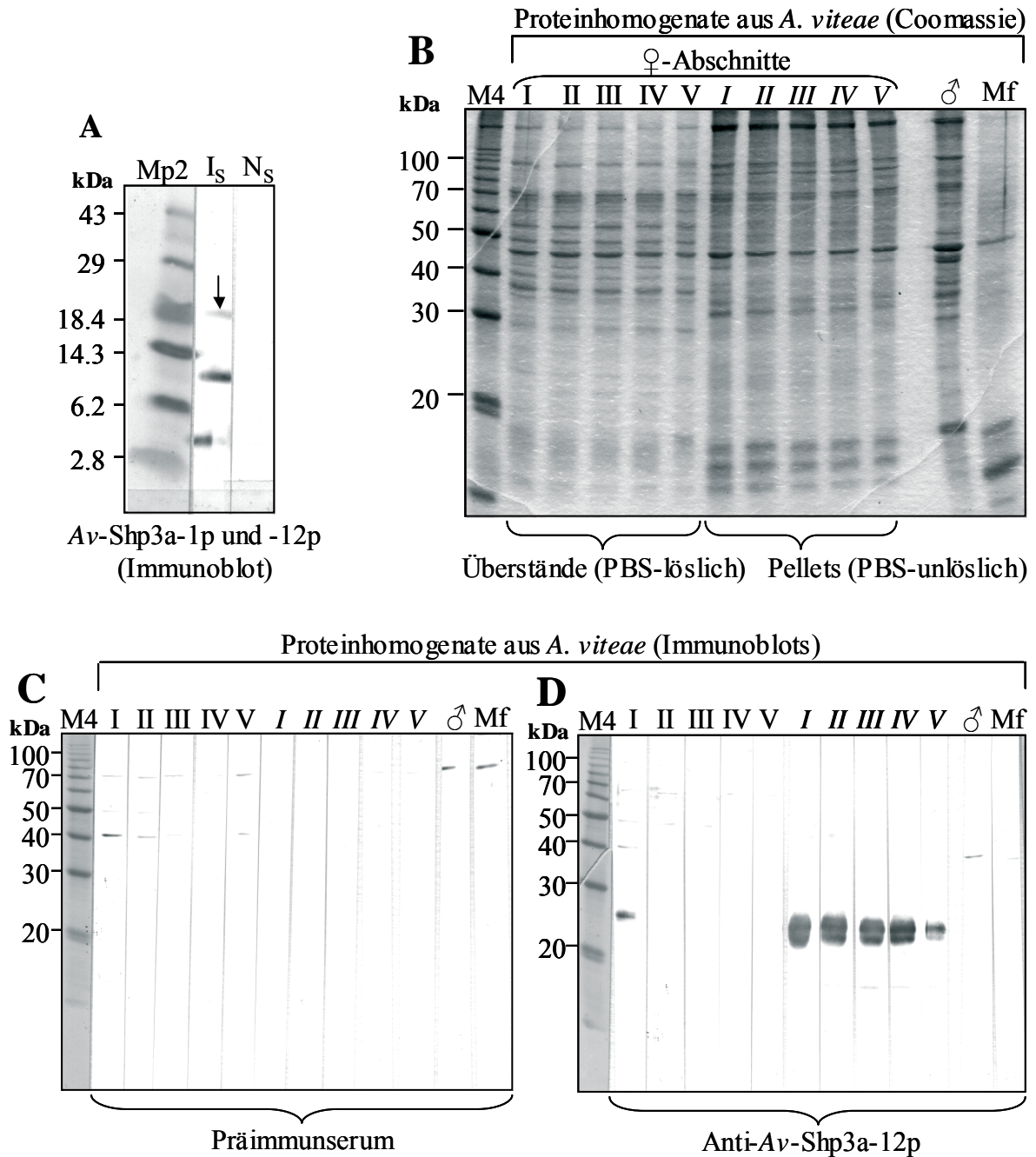
Mp1/Mp2 = Molekulargewichtsmarker (Kapitel 3.8.3.1)

Es handelte sich um Dimere des grösseren Proteins Av-Shp3a-1p was durch eine separate Auftragung der Peptide mit und ohne 8 M Harnstoff (Abb. 4-23C<sub>1</sub> bzw. C<sub>2</sub>) gezeigt werden konnte. Die starke Neigung zur Dimer-Bildung basiert vermutlich auf den drei Cysteinen in der AS-Sequenz [zwei Cysteine des C-Terminus und eines durch die ‚MCS‘ des Plasmid-Vektors pQE-30 (liegt im richtigen Leseraster noch vor dem *Pst*I-Klonierungsschnitt)], die möglicherweise an kovalenten intermolekularen Disulfid-Brückenbildungen beteiligt sind. Der korrekte Leseraster beider Expressions-Konstrukte wurde durch doppelsträngige Sequenzierung verifiziert. Die relativen Molekulargewichte beider rekombinanter Proteine in der SDS-PAGE entsprachen den errechneten Molekulargewichten.

Nach Immunisierung von Kaninchen mit Av-Shp3a-1p bzw. -12p wurden die Antisera im Immunoblot getestet (Abb. 4-24A). Beide rekombinanten Proteine wurden vom Antiserum gegen das klonierte Av-Shp3a-12p-Protein erkannt. Eine Kreuzreaktivität mit dem ‚6xHis tag‘ wurde durch einen Immunoblot mit drei anderen ‚6xHis tag‘-Proteinen ohne Bezug zu Av-Shp3a (freundlicherweise von E. Beck, Giessen zur Verfügung gestellt) ausgeschlossen (ohne Abb.).

Die Immunisierung mit dem grösseren rekombinanten Protein Av-Shp3a-1p führte nicht zur Bildung spezifischer Antikörper.





**Abbildung 4-24: Immunoblot von rekombinanten Proteinen und Av-Proteinhomogenaten mit Anti-Av-Shp3a-12p.**

**A:** Immunoblot-Analyse von Anti-Av-Shp3a-12p-Serum ( $I_s$  für Immunsersum) und Präimmunserum ( $N_s$ ) gegen die rekombinanten Proteine Av-Shp3a-1p und Av-Shp3a-12p. Die Auftrennung erfolgte auf einem Peptid-Gel, wobei je 100 ng beider 6xHis-Proteine pro Spur aufgetragen wurden. Immun- und Präimmunserum wurden jeweils 1:1.000 verdünnt. Anschliessend wurden die Streifen mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Verdünnung 1:3.000) und in 4-CN-Substrat inkubiert. Die Dimere von Av-Shp3a-1p (22 kDa, Abb. 4-21C und -C<sub>1</sub>) wurden vom Antiserum erkannt (Pfeil). **B:** verschiedene Proteinhomogenate aus *A. viteae* (SDS-PAGE, 12%, Coomassie-Färbung); in die Spuren I bis V wurden Proteinextrakte aus fünf definierten Wurmabschnitten (in der Reihenfolge von apikal nach kaudal, vgl. Kapitel 3.2.3) adulter Weibchen aufgetragen, wobei der PBS-lösliche Überstand getrennt von dem PBS-unlöslichen Pellet (Kursivschrift I-V) aufgetragen wurde. In den letzten zwei Spuren wurden Proteinhomogenate aus adulten Av-Männchen (♂) und Blutmikrofilarien (Mf) aufgetrennt. **C und D:** Immunoblot-Analysen mit Präimmunserum und Anti-Av-Shp3a-12p gegen Proteinhomogenate aus *A. viteae* (Proteinmenge und Probenreihenfolge wie in B, Immundetektion wie in A).

M4/Mp2 = Molekulargewichtsmarker (Kapitel 3.8.3 bzw. 3.8.3.1)

#### 4.7.2 Charakterisierung der Antisera

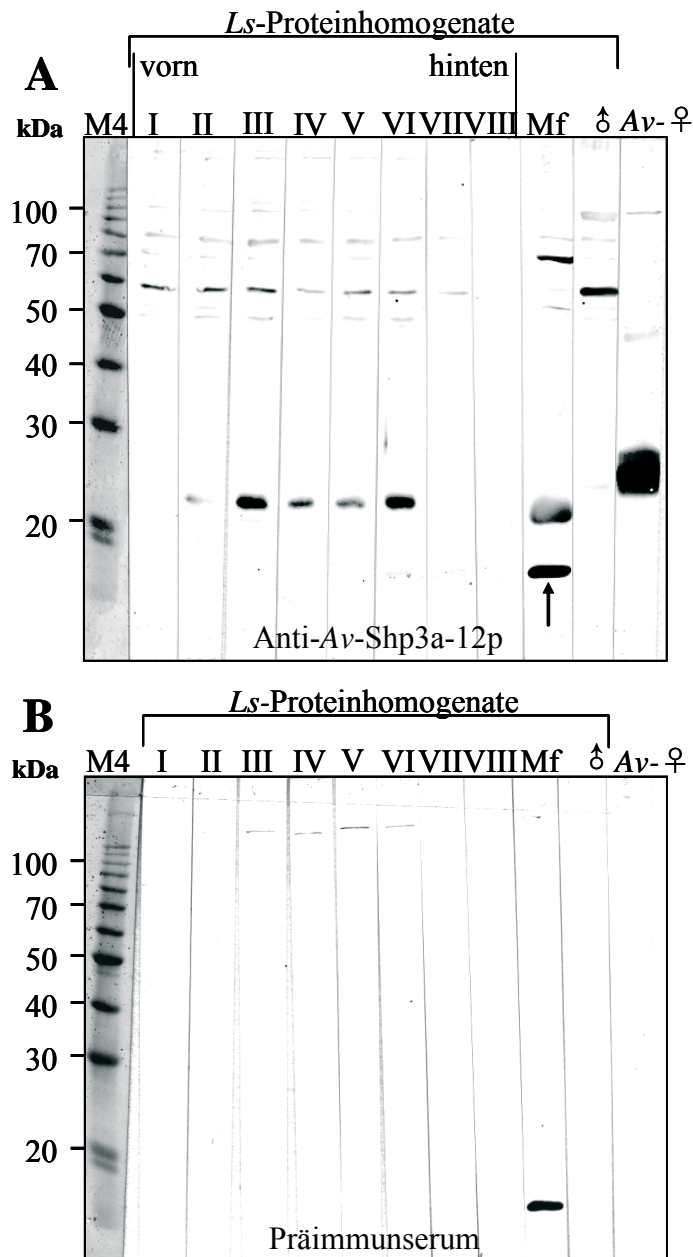
##### 4.7.2.1 Abklärung der Kreuzreaktivität mit einem Av-24 kDa-Antigen

Zur Charakterisierung der Av-Shp3a-Proteinexpression in verschiedenen Entwicklungsstadien wurde ein Immunoblot von Proteinhomogenaten aus Weibchen (definierte Wurmabschnitte), Männchen und Mikrofilarien und Anti-Av-Shp3a-12p-Serum durchgeführt. Nur in Proteinextrakten adulter Av-Weibchen war mittels der Immunoblot-Technik ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 24 kDa zu identifizieren, das in grösserer Menge im apikalen, den ersten 2.5 cm umfassenden Abschnitts des Wurmes vorlag (zur Lage der Wurmabschnitte zwecks Antigen-Gewinnung vgl. Kapitel 3.2.3) und ausschliesslich im PBS-unlöslichen Anteil der Proteinhomogenate nachzuweisen war (Abb. 4-24B, C und D). Im Abschnitt V (Proteinextrakt des anschliessenden Bereiches bis zum kaudalen Ende des Wurms) war die Reaktion mit dem Antikörper deutlich schwächer (Abb. 4-24D).

Aufgrund der Stadienspezifität und des Verteilungsmusters in Weibchen wurde vorerst angenommen, dass es sich bei diesem Protein um das native Av-Shp3a handelt. Wegen der Homologie von Av-Shp3a und Ls-Shp3a sowie Ls-Shp3, vor allem hinsichtlich des konservierten Tryptophan-Motivs WWCWW, wurde eine Kreuzreaktivität von Anti-Av-Shp3a-12p mit den *L. sigmodontis*-Proteinen postuliert.

Dies wurde in einer weiteren Serie von Immunoblots überprüft, wobei eine Reaktion in Form der Bindung des Anti-Av-Shp3a-12p-Serums an zwei *L. sigmodontis*-Moleküle in einer 40 kDa-Position (*Ls-Shp3a*) und einer 120 kDa-Position (*Ls-Shp3*) erwartet wurde. Statt dessen reagierte jedoch ein *L. sigmodontis*-Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 23 kDa, das vor allem in den mittleren Abschnitten weiblicher Würmer, nicht aber in *L. sigmodontis*-Männchen-Extrakten vorkam (Abb. 4-25A). Ein kleineres Protein aus Mikrofilarien reagierte gleichfalls mit Anti-Av-Shp3a-12p-Serum, jedoch wurde ein Molekül gleicher Masse auch vom Präimmunserum erkannt (Abb. 4-25B). Daneben kam es unter den gewählten Bedingungen (Abb. 4-25A) zu schwachen Reaktionen mit einer Reihe von weiteren Komponenten mit höherem Molekulargewicht. Diese Reaktionen konnten auch nicht durch Absorption an mit *E. coli* (Stamm M15)-Protein beschichteter PVDF-Folie reduziert werden (ohne Abb.), so dass als Grund für dieses unerwartete Ergebnis eine Reaktion des Antiserums mit Bakterienproteinen unwahrscheinlich war.

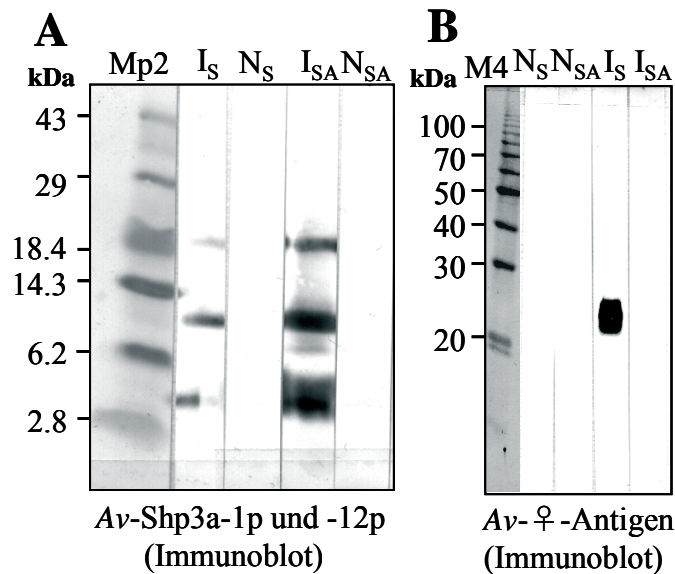




**Abbildung 4-25: Immunoblot-Analyse der Kreuzreaktion von Anti-*Av*-Shp3a-12p-Serum mit Proteinhomogenaten aus *L. sigmodontis*.**

20 Adulte *L.s.*-Weibchen (92 Tage p.i.) wurden in 8 Abschnitten (I – VIII) à 1 cm in der Reihenfolge von apikal nach kaudal zertrennt (vgl. HIRZMANN et al., 2002) und zur Homogenatherstellung aufgearbeitet (Kapitel 3.2.4). In zwei 12%igen SDS-PAGE-Gelen wurden unter reduzierenden Bedingungen Proteinextrakte aus den 8 *Ls*-♀-Abschnitten (I – VIII), aus *Ls*-Blutmikrofilarien (Mf), adulten *Ls*-Männchen (♂) sowie aus adulten *A. viteae*-Weibchen (*Av*-♀) aufgetrennt (Proteinmenge jeweils 10 µg). Die Western-Blots wurden mit Anti-*Av*-Shp3a-12p-Serum (**A**) oder Präimmunsrum (**B**) inkubiert (Verdünnung 1:1000, Peroxidase-Entwicklung). Die in A mit einem Pfeil gekennzeichnete Bande reagierte auch mit dem Präimmunsrum.

M4 = Molekulargewichtsmarker (Kapitel 3.8.3)



**Abbildung 4-26: Reaktion von affinitätsgereinigten Anti-Av-Shp3a-12p-Antikörpern.**

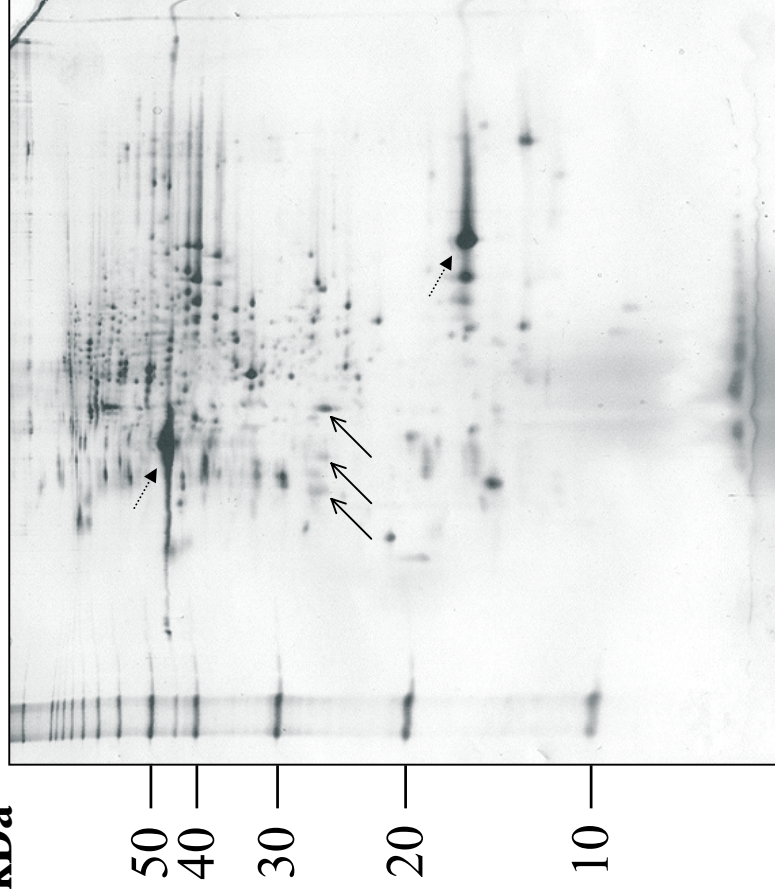
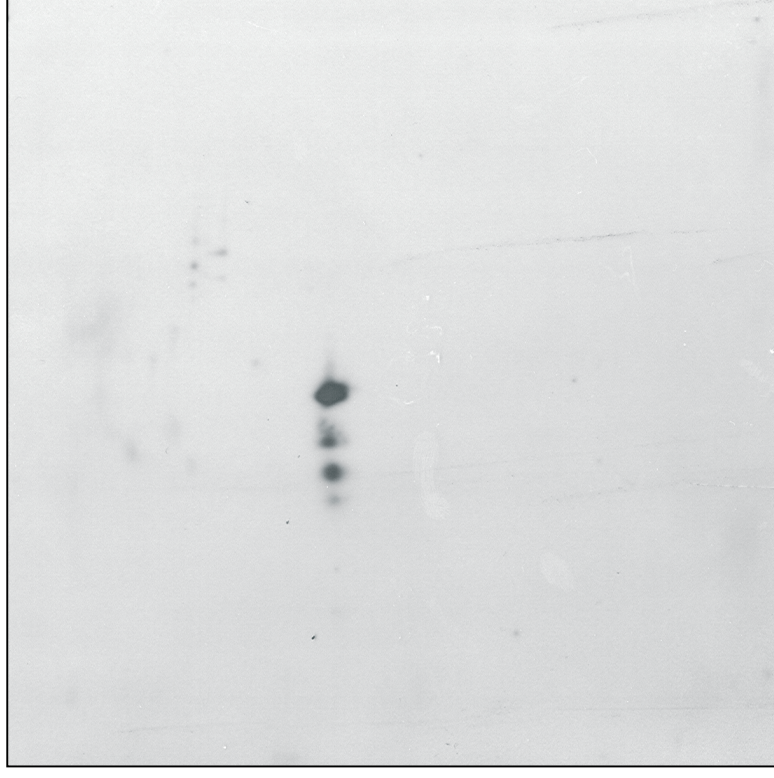
**A:** Reaktion von Anti-Av-shp3a-12p-Serum (I<sub>S</sub>) und affinitätsgereinigten Anti-Av-shp3a-12p-Antikörpern (I<sub>SA</sub>) sowie Präimmunserum (N<sub>S</sub>) und aufinitätsgereinigtem Präimmunserum (N<sub>SA</sub>) mit den rekombinanten Proteinen Av-Shp3a-1p und Av-Shp3a-12p und **B:** mit Proteinextrakt adulter Av-Weibchen. Die Sera wurden in einer Verdünnung von 1:1.000, die affinitätsgereinigten Antikörper von 1:5 eingesetzt. Die Auftrennung der rekombinanten Proteine (**A**) erfolgte mittels eines Peptidgels, wobei je 100 ng pro Spur aufgetragen wurden. Die Auftrennung der ♀-Proteine (**B**) erfolgte mittels eines 12%igen SDS-PAGE-Geles, wobei je 10 µg Antigen aufgetragen wurden. Beide Elektrophoresen wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

M4/Mp2 = Molekulargewichtsmarker (Kapitel 3.8.3 bzw. 3.8.3.1)

Um zu überprüfen, ob die Reaktionen von Proteinextrakten aus *A. viteae* und *L. sigmodontis* mit Anti-Av-Shp3a-12p-Serum im Immunoblot wirklich spezifisch waren, wurde das Immunserum an dem auf PVDF-Membran transferierten, rekombinanten Protein Av-Shp3a-12p aufgereinigt (Kapitel 3.10.1). Anstatt danach intensiver zu reagieren, was für eine spezifische Reaktion gesprochen hätte, verschwand die Reaktivität von Anti-Av-Shp3a-12p-Serum mit *A. viteae*-Proteinen (Abb. 4-26B). Um endgültig auszuschliessen, dass es sich bei dem 24 kDa-Protein aus *A. viteae*-Weibchen um Shp3a handelte, wurde das Protein N-terminal ansequenziert (hier danke ich für die freundliche Unterstützung durch Dr. D. Linder, Biochemisches Institut am Klinikum in Giessen). Zu diesem Zweck wurde das Vorderende adulter *A. viteae*-Weibchen in drei 2D-SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, wobei eines der Gele mit Silber gefärbt wurde und zwei auf PVDF-Membranen geblottet und mit Anti-Av-Shp3a-12p inkubiert wurden (Doppelansatz).

Silberfärbung des 2D-SDS-Polyacrylamidgeles

kDa

Immunoblot mit Anti-Av-Shp3a-12p  
(Nachweis mit Chemilumineszenz-Substrat)**Abbildung 4-27: Analyse des *A. viteae*-24 kDa-Proteins durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Immunoblot.**

2.5 cm lange Abschnitte vom Vorderende adulter *A. viteae*-Weibchen (vereinigt aus 23 Würmern; in diesem Bereich schien nach den bisherigen Ergebnissen die grösste Menge an diesem Protein vorhanden zu sein) wurden in Puffer für die Isoelektrische Fokussierung (IEF-Puffer) homogenisiert und nach Acetonfällung und Resuspension in IEF-Puffer in der 2D-SDS-PAGE aufgetrennt. Aliquots von jeweils 10 µl wurden nach der IEF (pH 2 bis 11) in drei 15 x 15 cm grossen SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt, wobei zwei der Gele (Doppelansatz) auf PVDF-Membranen gebロットet und eines mit Silber gefärbt wurde (linkes Bild). Zur besseren Lokalisation der Proteinspots wurden 2 Markerproteine (Equines Myoglobin, pI 7.0, MW 17.5 kDa und Bovines Muskel-Aktin, pI 5.0, 5.1, MW 43 kDa) mit dem Homogenat aufgetragen (Punktpfeile). Beide Blots wurden mit Anti-Av-Shp3a-12p-Serum und anschliessend mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Chemilumineszenz. Rechts ist einer der beiden Filme, die identische Spots zeigten, abgebildet. Mit Pfeilen sind, auf dem Gel-Bild links, drei der vier im Immunoblot reagierende Proteinspots gekennzeichnet. Der erste (von links nach rechts auf dem Immunoblot-Bild) und schwächste Spot konnte auf dem mit Silber gefärbten Gel nicht identifiziert werden.

Es reagierten vier Spots im 2D-Immunoblot mit identischen Molekulargewichten ( $M_r = 24$  kDa) (Abb. 4-27), die wahrscheinlich aufgrund von verschiedenen Modifikationen unterschiedliche isoelektrische Punkte aufwiesen. Der im Immunoblot am schwächsten reagierende Spot konnte in der Silberfärbung nicht identifiziert werden. Als nächstes wurde in einem 2D-SDS-Polyacrylamidgel Proteinextrakt aus *A. viteae* aufgetrennt, anschliessend auf PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie gefärbt. Die vier Spots, die im Immunoblot reagierten, wurden identifiziert, ausgeschnitten, vereinigt und der Sequenzierung zugeführt. Die aminoterminalen Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Edman-Abbaus.

Auf diese Weise konnten bei den vier Peptiden in einer N-terminalen Sequenz von 11 AS neun AS identifiziert werden (Abb. 4-28). Das Ergebnis bestätigte, dass es sich bei den vier Spots um gleiche Proteine handelte, die aber nicht mit *Av-Shp3a* identisch sind. In der Datenbank konnte eine Homologie zur abgeleiteten AS-Sequenz mehrerer *Bm*-cDNA-Klone (Identität 7/9 AS, Abb. 4-28) mit unbekannter Funktion ermittelt werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11									
	?	Y	W	N	Q	P	Y	E	L	?	Q									
1	K	Q	M	H	S	I	W	S	T	T	I	T	V	L	F	L	F	A	I	V
21	E	R	S	N	A	A	L	K	N	Q	T	G	E	G	R	Y	Y	W	G	Q
41	P	Y	G	L	P	Q	W	Q	A	Q	Q	G	W	V	P	Q	Q	N	W	M
61	Q	P	Q	G	G	I	T	S	Q	G	W	A	L	P	Q	G	G	M	P	M
81	T	G	W	V	P	S	S	M	Q	P	T	P	P	P	F	L	W	T	L	F
101	D	D	R	N	V	C	T	L	D	A	S	I	L	V	V	L	E	N	D	G
121	S	T	A	P	G	G	M	D	I	N	A	Q	L	L	S	A	Y	Y	G	G
141	D	L	S	S	N	A	V	R	M	P	C	S	S	I	A	T	T	S	A	Q
161	A	C	K	H	Y	T	I	S	V	E	D	V	H	G	F	L	I	N	S	T
181	R	T	P	C	W	S	I	P	R	Y	C	I	T	N	I	S	T	K	*	

**Abbildung 4-28: N-terminale Ansequenzierung des 24 kDa-*Av*-Proteins (oben) und Homologie zu der abgeleiteten AS-Sequenz eines *Bm*-cDNA-Klons aus der Datenbank (unten).**

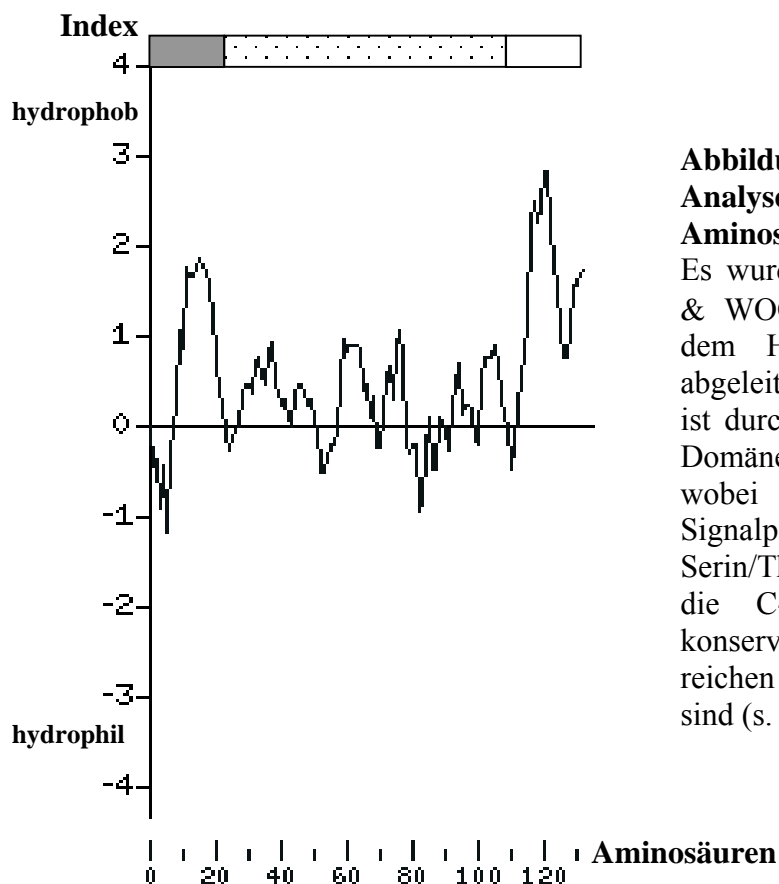
Oben (eingerahmt) ist die aminoterminalen Ansequenzierung des *A. viteae*-Proteins (mit Fragezeichen sind nicht eindeutig zu bestimmende AS angegeben; nach der 11 AS brach die Sequenzierung ab) dargestellt. Darunter ist die Homologie zur abgeleiteten AS-Sequenz des *Bm*-cDNA-Klons SWAMCAC24F11SK aus der Datenbank angegeben. Die unterstrichenen AS sind mit der N-terminalen *A. viteae*-Sequenzierung identisch (7/9). Mit grau ist das potentielle Signalpeptid hinterlegt; das Start-Kodon ist umrahmt.

Der Grund für die Kreuzreaktion des 24 kDa-Proteins mit Anti-Av-Shp3a-12p kann anhand der AS-Sequenz, auch unter Berücksichtigung des möglicherweise homologen *B. malayi*-Proteins, nicht erkannt werden. Beim Ausfällen des rekombinanten Peptids während der Dialyse gegen PBS kam es möglicherweise zu einer fehlerhaften Faltung, wobei neue, veränderte Epitope entstanden.

#### 4.7.2.2 Darstellung von Av-Shp3a in *A. viteae*-Extrakten

In Anbetracht des bis dahin erfolglosen Versuchs, natives Av-Shp3a in Parasiten nachzuweisen wurde nach alternativen Methoden gesucht.

Die C-terminale Region von Av-Shp3a enthält viele hydrophobe AS mit dem besonders auffälligen, identisch zu *L. sigmodontis*- und *B. malayi*-Shp3 und -3a konservierten Tryptophan-reichen Motiv WWCWW. Eine Hydrophobizitätsanalyse der *A. viteae-shp3a*-Aminosäuresequenz ist in Abb. 4-29 dargestellt.



**Abbildung 4-29: Hydrophobizitäts-Analyse der *A. viteae-shp3a*-Aminosäuresequenz.**

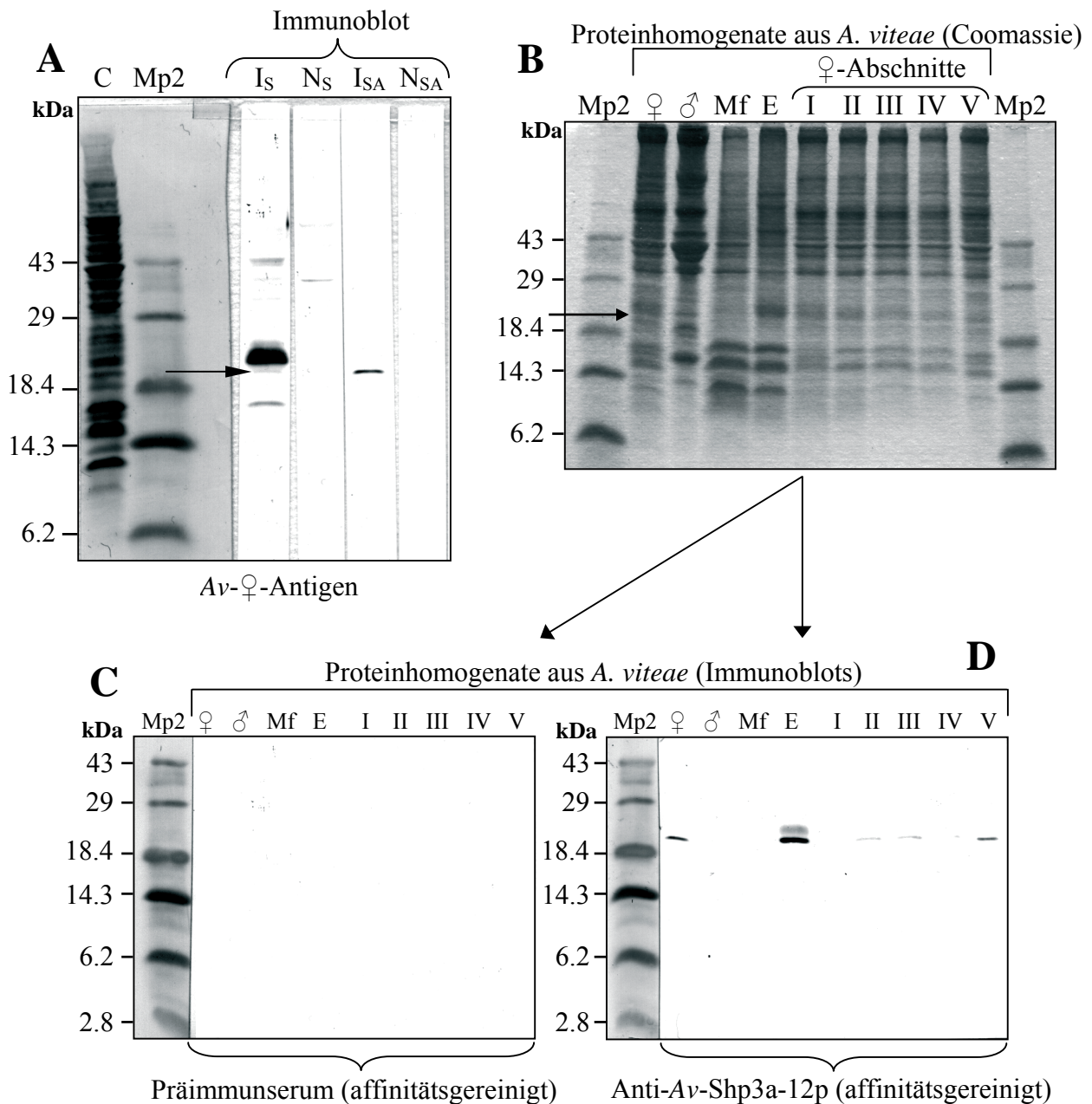
Es wurde der Algorithmus nach HOPP & WOODS (1981) angewendet. Über dem Hydrophobizitäts-Diagramm der abgeleiteten AS-Sequenz von *Av-shp3a* ist durch einen Balken schematisch die Domänen-Struktur wiedergegeben, wobei mit grau das hydrophobe Signalpeptid, gepunktet der Serin/Threonin-reiche Bereich und weiss die C-terminale Region mit dem konservierten hydrophoben Tryptophan-reichen WWCWW-Motiv dargestellt sind (s. auch Abb. 4-18).



Andere modifizierte Oberflächenproteine mit Serin/Threonin-reichen Wiederholungseinheiten besitzen in der C-terminalen Region oft eine Transmembran-Domäne (z.B.: Zellmembran-assoziierte Muzine; HILKENS et al., 1992) oder eine Phosphatidylinositol-Anker-ähnliche Sequenz (z.B.: Muzin-ähnliche Glykoproteine von *Trypanosoma*; DI NOIA et al., 1995). Für die Darstellung von isolierten membranständigen Oberflächenproteinen mit hydrophoben Bereichen im Immunoblot verwendeten MANDRELL und ZOLLINGER (1984) erfolgreich einen Transfer-Puffer mit dem zwitterionischen Detergenz CHAPS.

Durch Anwendung dieser Modifikationen der Methode gelang es schliesslich mit Anti-Av-Shp3a-12p-Antikörpern im Proteinhomogenat adulter Av-Weibchen ein natives Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 22 kDa (Abb. 4-30A) nachzuweisen. Die schwache Reaktion dieses Proteins mit dem polyklonalen Anti-Av-Shp3a-12p-Serum wurde nach Affinitätsreinigung der Antikörper deutlich stärker, wohingegen die starke Kreuz-Reaktion mit dem 24 kDa-Protein ausblieb. Das 22 kDa-Protein konnte unter den gleichen Bedingungen weder in adulten Männchen oder Blutmikrofilarien, noch im apikalen, 1 cm umfassenden Abschnitt adulter Weibchen, der aus der Eihülle geschlüpfte Mikrofilarien enthält (Abschnitt I), nachgewiesen werden (Abb. 4-30D). Die stärkste Reaktion war mit Gesamt-Embryonalstadien zu finden. Aufgrund der Daten wird angenommen, dass es sich bei dem 22 kDa-Antigen um Av-Shp3a handelt. Allerdings muss vermerkt werden, dass bei den Gesamt-Embryonalstadien neben den 22 kDa-Protein auch ein etwas grösseres Protein schwach mit dem Antikörper reagierte.

Das 22 kDa-Protein konnte auch im letzten Wurmabschnitt (Abschnitt V) nachgewiesen werden (Abb. 4-30D), wobei hier die Reaktion verglichen mit den Abschnitten II, III und IV sogar am stärksten war. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch nicht dem Ergebnis des Transkriptionsprofils durch RT-PCR (Kapitel 4.6), weil der Abschnitt V im Unterschied zu dem letzten definierten Einzelwurm-Segment für die RT-PCR (Segment 4) (Abb. 4-22), dem Bereich 2.5 cm nach dem apikalen Ende bis zum kaudalen Ende des Wurmes entspricht. In diesem Wurmabschnitt sind also auch Ring- und Brezelstadien vorhanden (bis ca. 3.5 cm nach dem Vorderende, vgl. Abb. 3-1). Im Segment mit Ring- und Brezelstadien (Einzelwurm-Segment 2) wird das Av-shp3a-Gen vergleichsweise sogar am stärksten transkribiert (Abb. 4-22B).



**Abbildung 4-30: Immunoblot-Nachweis des nativen Av-Shp3a in *A. viteae* mit den Anti-Av-Shp3a-12p-Antikörpern nach Western-Transfer in Anwesenheit des zwitterionischen Detergenz' CHAPS.**

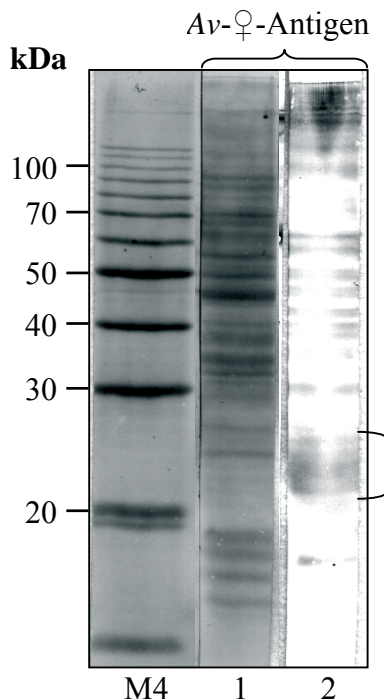
**A:** Reaktion von Anti-Av-Shp3a-12p-Serum und Präimmunserum ( $I_S$  bzw.  $N_S$ ) mit Proteinextrakt adulter Av-Weibchen im Immunoblot und affinitätsgereinigten Antikörpern ( $I_{SA}$  und  $N_{SA}$ ). Im Unterschied zum Immunoblot in Abb. 4-26B erfolgte der Transfer auf die PVDF-Membran in Anwesenheit von 0.4% CHAPS. Mit einem Pfeil ist die schwache Reaktion des nativen Proteins Av-Shp3a ( $M_r = 22$  kDa) mit dem Antiserum vor der Affinitätsreinigung hervorgehoben, das unmittelbar unter der kräftig-gefärbten, ansequenzierten Proteinbande ( $M_r = 24$  kDa, verschwindet nach Affinitätsreinigung) liegt. Ein Streifen mit dem Antigen wurde mit Coomassie gefärbt (C). **B:** Coomassie gefärbtes Peptidgel (reduzierende Bedingungen) mit Proteinextrakten aus adulten Av-Weibchen (♀), Männchen (♂), Blutmikrofilarien (Mf), Gesamt-Embryonalstadien (E) sowie aus fünf definierten Wurmabschnitten adulter Weibchen (I-V; in der Reihenfolge von apikal nach kaudal, vgl. Kapitel 3.2.3) (die zu erwartende Position von Av-Shp3a ist mit einem Pfeil gekennzeichnet). **C** und **D:** Immunoblot-Reaktionen mit affinitätsgereinigtem Präimmunserum bzw. Anti-Av-Shp3a-12p-Serum (Proteinmenge und Probenreihenfolge wie in **B**; Peptidgele; Transfer mit 0.4% CHAPS). Die Sera wurden 1:5 und das Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat 1:3.000 verdünnt. Mp2 = Molekulargewichtsmarker (Kapitel 3.8.3.1)

#### 4.7.3 Versuch des Nachweises posttranslationaler Modifikationen von Av-Shp3a

Beim homologen Gen aus *L. sigmodontis* machen posttranslationale Modifikationen etwa 75% der Masse aus (HIRZMANN et al., 2002) und bestehen im Wesentlichen aus über Phosphodiester-Bindungen an Serin/Threonin gebundenes Dimethylaminoethanol (DMAE; HINTZ et al., 1996). DMAE scheint bei *A. viteae* jedoch keine Rolle zu spielen. Der Versuch, DMAE mit DMAE-reaktiven Antikörpern per Immunoblotting in Extrakten von adulten weiblichen und männlichen *A. viteae* nachzuweisen, schlug fehl (ohne Abb.). Es handelte sich um Antikörper gegen die Scheidenoberfläche von *L. sigmodontis*, die durch Affinitätsreinigung von Kaninchen-Antiseren gegen lösliche Scheiden-Extrakte an fixierten Mikrofilarien gewonnen worden waren (SCHARES et al., 1994).

Eine bei Helminthen allgemein und insbesondere bei Filarien häufige posttranslationale Modifikation von Polypeptiden erfolgt durch Phosphorylcholin (PC), wobei das PC an N-glykosilierte Glykane gebunden ist (HASLAM et al., 1999). Um solche Modifikationen bei *A. viteae* zu überprüfen, wurde ein Extrakt aus adulten weiblichen *A. viteae* im Immunoblot mit einem PC-spezifischen monoklonalen Antikörper (TEPC15, Sigma) zur Reaktion gebracht (Abb. 4-31). Erwartungsgemäss reagierte eine Vielzahl von Wurmkomponenten mit TEPC15. Auffallend war, dass dies in besonderem Mass den Bereich zwischen 21 kDa und 24 kDa betraf. Eine direkte Zuordnung zu einem 22 kDa-Molekül war nicht möglich, doch kann nach diesem Ergebnis mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vermutet werden, dass das Av-Shp3a diese Modifikationen trägt. Zumindest ist es nicht auszuschliessen.





**Abbildung 4-31: Nachweis von Phosphorylcholin (PC)-Modifikationen von Proteinen in *A. viteae*-Weibchen-Extrakt mittels Immunoblot.**

Proteinextrakt aus *A. viteae*-Weibchen wurde in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschliessend auf PVDF-Membran geblottet. Ein Membranstreifen wurde mit Coomassie gefärbt (1) und einer (2) zuerst mit einem Antikörper gegen PC-Epitope (monoklonaler Maus-IgA, kappa, TEPC15, Verdünnung 1:1000) und anschliessend mit einem Anti-IgA-Peroxidase-Konjugat (Verdünnung 1:3000) inkubiert. Der Immunnachweis erfolgte mit dem chromogenen Substrat 4-CN. Der Bereich zwischen 21 und 24 kDa, der mit dem Anti-PC-Antikörper reagiert, ist mit einer Klammer hervorgehoben.

M4 = Molekulargewichtsmarker (Kapitel 3.8.3)

#### 4.7.4 Versuch der immunhistologischen Darstellung von Av-Shp3a

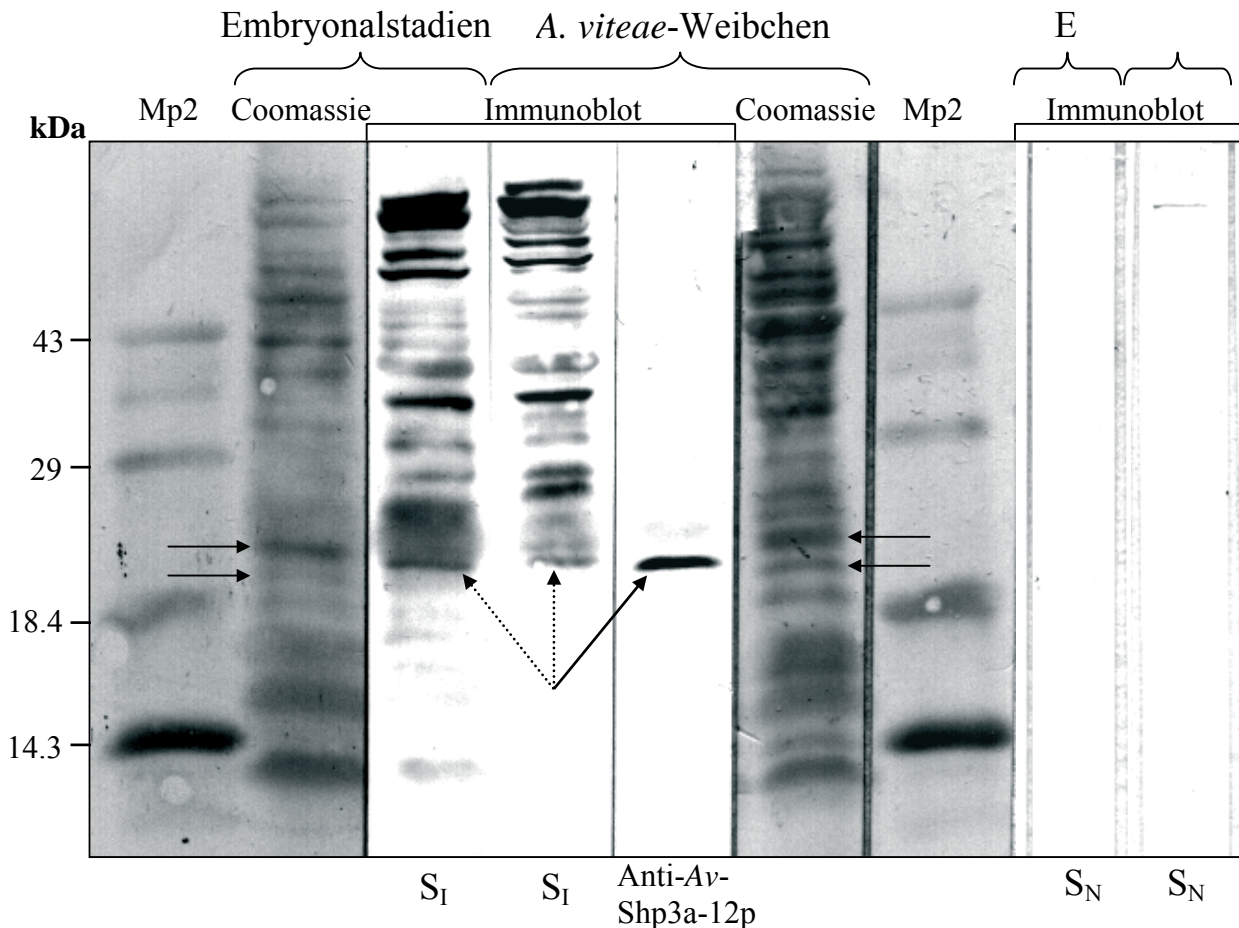
Ein immunhistologischer Nachweis von Av-Shp3a mittels Anti-Av-Shp3a-12p gelang weder in Kryoschnitten von adulten Weibchen noch in Schnitten in Paraffin eingebetteter Parasiten (ohne Abb.).

#### 4.7.5 Versuch der Agglutination von Blutmikrofilarien durch Anti-Av-Shp3a-12p

Av-Shp3a resp. Av-Shp3a-12p-homologe Strukturen finden sich nach dem Ergebnis von Agglutinationsassays mittels Anti-Av-Shp3a-12p-Serum nicht auf der Oberfläche von Blutmikrofilarien, da die polyklonalen Antikörper aus Kaninchen die Mikrofilarien *in vitro* nicht zu agglutinieren vermochten. Zur Kontrolle eingesetzte, 140 Tage p.i. aus *A. viteae*-infizierten *M. coucha* isolierte Seren führten dagegen zur Agglutination von ca. 20% der Larven (ohne Abb.).

#### 4.8 Immunreaktionen gegen Av-Shp3a in infizierten *M. coucha*

Um zu überprüfen, ob mit *A. viteae* infizierte *M. coucha* Antikörper gegen Shp3a bilden, wurden Seren solcher Tiere im Immunoblot mit den rekombinanten Proteinen und Proteinextrakten aus Weibchen getestet.



**Abbildung 4-32: Reaktion von gepoolten Seren (Tag 140 p.i.; n = 8) *A. viteae*-infizierter *M. coucha* mit Antigenen aus Av-Weibchen und Embryonalstadien im Immunoblot.**

Homogenate aus Av-Embryonalstadien und adulten Av-Weibchen wurden elektrophoretisch aufgetrennt (Peptidgel unter reduzierenden Bedingungen), in Anwesenheit von 0.4% CHAPS auf PVDF-Membran transferiert und mit gepoolten, 1:10 verdünnten Seren (n = 8) *A. viteae*-infizierter ( $S_I$ ; 140 Tage p.i.) und nicht infizierter *M. coucha* ( $S_N$ ) sowie 1:5 verdünnten, affinitätsgereinigten Anti-Av-Shp3a-12p-Antikörpern zu Reaktion gebracht. Als Konjugat diente 1:10 verdünntes, Peroxidase-konjugiertes Antiserum gegen *M. coucha*-IgG aus Kaninchen. Die Entwicklung erfolgte mit chromogenem Substrat (4-CN). Mit gepunkteten Pfeilen sind zwei Proteinbanden hervorgehoben, die von den Patenzseren erkannt werden und das gleiche Molekulargewicht aufweisen wie Av-Shp3a (normaler Pfeil). In den mit Coomassie gefärbten Blot-Streifen kann Av-Shp3a nicht identifiziert werden: es liegt zwischen den mit kleinen Pfeilen gekennzeichneten Banden.

Mp2 = Molekulargewichtsmarker (Kapitel 3.8.3.1)

Zunächst wurden Poolseren, die zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion entnommen worden waren (14, 33, 70, 95 und 150 Tage p.i.; n = 5) im Immunoblot auf ihre Reaktivität gegen die beiden rekombinanten Proteine Av-Shp3a-1p und -12p getestet. Die am Tag 95 p.i. eingesetzten Tiere wiesen eine Mikrofilariämie von durchschnittlich 260 Mff/ $\mu$ l auf.

Als Konjugat kam der nach Kapitel 3.10.2 selbst hergestellte, polyklonale Peroxidase-konjugierte Anti-*M. coucha*-IgG-Antikörper aus Kaninchen zum Einsatz.

Antikörper gegen die rekombinanten Proteine konnten zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion in den Versuchstierseren nachgewiesen werden (ohne Abb.).

In einem anschliessenden Versuch wurde die Reaktion eines *M. coucha* Poolserums vom 140. Tag p.i. (n = 8; durchschnittliche Mikrofilariämie: 110 Mff/ $\mu$ l) gegen Extrakte aus *A. viteae*-Weibchen und intrauterinen Embryonalstadien per Immunoblot überprüft. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Kapitel 4.7.2.2 erfolgte der Antigentransfer auf PVDF-Membran in Anwesenheit von CHAPS. Zur Kontrolle wurde neben den Infektionsseren Anti-Av-Shp3a-12p eingesetzt.

Die Infektionsseren reagierten mit einer Vielzahl von Parasiten-Polypeptiden (Abb. 4-32), wobei sich zwischen den Antigenen leichte Unterschiede ergaben. Eine Antikörperbindung an das mittels Anti-Av-Shp3a-12p lokalisierte Av-Shp3a erschien wahrscheinlich, nachdem ein Antigen mit entsprechendem relativen Molekulargewicht in beiden Extrakten erfasst wurde. Mit letzter Sicherheit war dies allerdings nicht nachzuweisen, da im fraglichen kDa-Bereich mehrere reaktive Antigene auftraten. Eine Identifikation von Av-Shp3a in der Coomassie-Färbung war nicht möglich.

## 5.

DISKUSSION

Innerhalb der Superfamilie Filarioidea besteht eine Dichotomie, indem bei einigen Gattungen die Larven 1, die Mikrofilarien, von einer sog. Scheide umgeben sind, bei anderen Arten aber von den weiblichen Parasiten ohne diese Scheide freigesetzt werden. Zur ersteren Gruppe gehören u. a. die Erreger der lymphatischen Filariose des Menschen *Wuchereria bancrofti*, *Brugia* spp. – sowie verschiedene tierspezifische Arten, wie die Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis*, zur zweiten u. a. die Gattungen *Acanthocheilonema*, *Dirofilaria* und *Onchocerca*. Im Zusammenhang mit dieser Dichotomie erhebt sich die Frage, inwieweit Gene, die für Eihüllen- und Scheidenproteine kodieren oder deren Expression auf Gattungen beschränkt sind, die Mikrofilarienscheiden bilden.

Da nach morphologischen Kriterien bei der Eihüllenbildung kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht, war anzunehmen, dass Proteine der Scheidenmatrix, die aus der primären Eihülle entsteht, konserviert sind. Folgerichtig konnten die zu *shp1*, *shp1a* und *shp2* von *L. sigmodontis* und *Brugia* spp. orthologen Gene von *A. viteae* kloniert und z.T. charakterisiert und *shp1* und *shp2* von *O. volvulus* durch Datenbanksuchen identifiziert werden (HIRZMANN et al., 2001).

Überraschend war allerdings, dass bei *A. viteae* auch eine zu *shp3a* homologe cDNA-Sequenz gefunden wurde (HIRZMANN & ZAHNER, 2000) (vgl. Kapitel 8.1). Die Proteine Shp3 und Shp3a sind Oberflächenproteine der Mikrofilarienscheide (SCHARES et al., 1994) und werden bei *L. sigmodontis* und *Brugia* spp. im terminalen Unterusabschnitt, der gestreckte Mikrofilarien enthält, exprimiert und auf die Scheidenoberfläche sekretiert (SCHARES et al., 1994; HIRZMANN et al., 2002). Sie sind hochgradig posttranslational modifiziert (HINTZ, 1995; HINTZ et al., 1996; KASPER, 2000) und spielen wahrscheinlich eine Rolle in der Immunevasionsstrategie der Parasiten, denn sie werden von parasitärmischen Wirten immunologisch nicht erkannt (BARDEHLE, 1990; ZAHNER et al., 1995).

Das Vorhandensein eines orthologen *shp3a*-Gens bei *A. viteae* warf die Frage auf, ob sich Shp3a-ähnliche Proteine bei dieser Art und evtl. auch bei anderen Arten mit unbescheideten Mikrofilarien wie *O. volvulus* auf der Mikrofilarienoberfläche finden und eine vergleichbare Rolle wie Shp3a bei *L. sigmodontis* und *Brugia* spp. spielen. Verbunden damit war auch die Frage nach der Existenz eines paralogen *Av-shp3*-Gens.

Zu Beginn dieser Studie wurden durch Southern Blot-Analyse genomischer *A. viteae*-DNA die Ergebnisse der auf PCR basierenden Vorversuche (HIRZMANN & ZAHNER, 2000) (vgl. Kapitel 8.1) bestätigt, dass bei *A. viteae* ein *shp3a*-Gen mit Homologie zu dem von *L. sigmodontis* und *B. malayi* existiert. Der Southern Blot wurde mit einer amplifizierten *Av-shp3a*-Sonde hybridisiert, die das gesamte zweite Exon mit 78% der kodierenden Sequenz enthielt. Die Anwesenheit von jeweils nur einem DNA-Fragment (Abb. 4-1) deutet darauf hin, dass es sich bei *Av-shp3a* um ein Single-Copy-Gen handelt, und dass sich ein möglicherweise vorhandenes paralogenes *Av-shp3*-Gen in seinem 3'-kodierenden Bereich so sehr unterscheidet, dass im Southern Blot keine Kreuzreaktion mit diesem zustande kommt. Solche Kreuzreaktionen treten bei *L. sigmodontis* auf, wo die 3'-kodierenden Bereiche der *shp3a*- und *shp3*-Gene bis zu 97% identisch sind (HIRZMANN, 1997).

Das 5'-Ende und die Kodierregion der cDNA von *Av-shp3a* waren bereits vor Beginn dieser Studie bekannt (vgl. Kapitel 8.1). Am 5'-Ende der *Av-shp3a*-cDNA befindet sich die vollständige 22nt-*Trans*-Spleiss-,Leader'-Sequenz (vgl. HIRZMANN & ZAHNER, 2000) (Abb. 4-2). Demnach wird das *Av-shp3a*-Primär-Transkript wie die *shp3*- und *shp3a*-Transkripte von *L. sigmodontis* und *B. malayi* (HIRZMANN et al., 2002) durch *Trans*-Spleissen prozessiert. Aufgrund der *Trans*-Spleiss-Prozessierung stimmt das 5'-Ende der ‚reifen‘ mRNA nicht mit dem Transkriptionsstart überein. In Nematoden werden 70-80% der Transkripte durch eine *Trans*-Spleissreaktion prozessiert (NILSEN, 1993 und 1995; ZORIO et al., 1994), bei der eine identische 22 nt-SL-Sequenz am 5'-Ende der Transkripte angefügt wird. Welche biologische Bedeutung das *Trans*-Spleissen besitzt, ist bisher nicht bekannt.

Bei *Ls-shp3* und *-3a* befindet sich der durch RACE-PCR bestimmte Transkriptionsstart in einem zwischen *Brugia* spp. und *L. sigmodontis* konservierten CA-Dinukleotid (HIRZMANN et al., 2002), welches in vielen eukaryontischen Promotoren als CAP-Signal konserviert ist (LARSEN et al., 1995). Diese Position für den Transkriptionsstart einschliesslich der flankierenden Sequenz ist auch bei *A. viteae* konserviert (Abb. 4-5). Das 3'-Ende der *Av-shp3a*-cDNA wurde durch eine PCR mit revers transkribierter *A. viteae*-♀-polyA<sup>+</sup>-RNA, mit den Primern *Av3-3* und (dT)<sub>21</sub>-Sal/Xho vervollständigt. Zwei potentielle Polyadenylierungssignale in der 3' nicht translatierten *Av-shp3a*-Sequenz sind auch bei *B. malayi* und *L. sigmodontis* (dort nur das zweite) (HIRZMANN, 1997) konserviert (in Abb. 4-2 durch Unterstreichung hervorgehoben).

Die AS-Sequenz von *Av-shp3a*, die von den genomischen Sequenzen der Phagenklone  $\lambda$ Av3-1 und  $\lambda$ Av3-2 (Abb. 4-10) nach Vergleich mit den amplifizierten cDNA-Fragmenten abgeleitet wurde und mit dem ersten Methionin-Kodon nach der *Trans*-Spleiss-Akzeptorstelle beginnt, ergibt ein Polypeptid von 133 AS [123 AS für *Ls-shp3a* und 140 AS für *Bm-shp3a* (HIRZMANN et al., 2002)] (Abb. 4-2). Wie bei *shp3* und *shp3a* von *B. malayi* und *L. sigmodontis* kann die abgeleitete AS-Sequenz in drei Abschnitte unterteilt werden (Abb. 5-1). Die N-terminale Region (AS 1-23) entspricht einer sekretorischen Standard-Signalsequenz (SignalV2.0, CBS) mit einer vorhersagbaren Protease-Schnittstelle zwischen Ser<sup>23</sup> und Ser<sup>24</sup> (Abb. 4-2). Demnach ist der N-Terminus des reifen Proteins die Serin/Threonin-reiche Region [AS 24-108 mit 48 Ser/Thr von 85 AS (57%)], die vier nahezu identische, repetitive Peptide aufweist. Der dritte Abschnitt, die C-terminale Region (AS 109-133), enthält mehrere hydrophobe Aminosäuren und ein besonders auffälliges, bei allen drei Spezies konserviertes Tryptophan-reiches Motiv: WWCWW (Abb. 5-1). Bei *Av-Shp3a* handelt es sich damit wie bei den orthologen Proteinen aus *L. sigmodontis* und *Brugia* spp. um ein Muzin-ähnliches Protein (vgl. THEODOROPOULOS et al., 2001)

Die homologen Gene *shp3a* und *shp3* sind bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* in einem Tandem mit einem Abstand von 5,5 kb organisiert (HIRZMANN et al., 2002). Um festzustellen, ob bei *A. viteae* ein orthologes Gen *shp3* vorhanden ist, wurde eine genomische Phagenbank mit der amplifizierten Sonde aus dem 3'-kodierenden Bereich von *Av-shp3a* gescreent. Zwei positive Klone wurden isoliert und analysiert. Die Ansequenzierung des Phagenklons  $\lambda$ Av3-2 (es handelte sich um den Bereich ca. 6 kb stromaufwärts von *Av-shp3a*) führte zur Identifizierung der konservierten Promotor-Region vom paralogen Gen *Av-shp3* (Abb. 4-5). Die Orientierung von *Av-shp3a* zu der des *Av-shp3*-Promoters ist im Unterschied zu den Genen von *B. malayi* und *L. sigmodontis* divergent, was auch die Tatsache erklärt, dass die konservierte Promoter-Sequenz stromaufwärts von *Av-shp3a* gefunden wurde (Abb. 4-9). Ein Homologievergleich der 5'-flankierenden Promotor-Sequenzen der Gene *shp3* und *shp3a* von *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *A. viteae* über eine Länge von 198 bp ergab eine Identität von 75%.



Beim Vergleich der sechs Promotor-Sequenzen fallen neben einer Konsensus-TATA-Box zwei weitere Grundelemente von eukaryontischen Promotoren auf - eine GC-Box und eine CCAAT-ähnliche Sequenz (vgl. LARSEN et al., 1995). Letztere ist eine dreimalige Tandemwiederholung der Sequenz CAATT, die ein weiteres Mal als Monomer 9 bp stromaufwärts der TATA-Box vorkommt. Die 5'-flankierenden Sequenzen der Gene *shp3* und *shp3a* von *L. sigmodontis* und *B. malayi*, die in der Abb. 4-5 dargestellt sind, weisen untereinander eine 100%ige Identität auf. Bei *A. viteae* besteht ‚nur noch‘ eine 92%ige Identität untereinander, wobei es in der TATA- und der GC-Box sowie in dem repetitiven CAATT-Sequenzelement punktuelle Unterschiede gibt. Ferner ist die *HindIII*-Restriktionsschnittstelle bei *Av-shp3* nicht konserviert, und stromabwärts der TATA-Box fehlen gar im Vergleich zu *shp3a* 15 Nukleotide. Somit fehlt bei *Av-shp3* auch das zwischen *Bm-shp3/3a*, *Ls-shp3/3a* und *Av-shp3a* konservierte CA-Dinukleotid, welches in vielen eukaryontischen Promotoren als CAP-Signal konserviert ist (LARSEN et al., 1995), und in dem sich bei *L. sigmodontis* der Transkriptionsstart befindet (HIRZMANN et al., 2002). Diese Unterschiede lassen daran zweifeln, dass der *Av-shp3*-Promotor aktiv ist.

Um die Sequenz stromabwärts des *Av-shp3*-Promotors zu analysieren, war die Isolierung von weiteren genomischen Phagenklonen notwendig. Mit Hilfe einer Sonde aus dem *Av-shp3*-Promotorbereiches wurden nach erneutem Screening der genomischen *A. viteae*-Phagenbank weitere drei Klone isoliert. Die Spezifität dieser Digoxigenin-markierten Sonde für das *Av-shp3*-Gen war vorher durch eine genomische Southern Blot-Analyse überprüft worden (Abb. 4-6). Die Sequenzierung zweier dieser Klone ( $\lambda$ Av3-4 und  $\lambda$ Av3-5) ergab eine zusätzliche Sequenz von 1850 bp stromabwärts des *Av-shp3*-Promotors (Abb. 4-10). Diese Sequenz zeigte entgegen den Erwartungen keinerlei Ähnlichkeit mit dem Kodierbereich des *shp3*-Gens von *L. sigmodontis* und *B. malayi* und des *shp3a*-Gens von *A. viteae*, sondern eine starke Homologie zu einem Bereich stromabwärts des *Ls-shp3*-Gens (ca. 900 bp distal des Polyadenylierungssignals; Abb. 4-7). Der Abstand zwischen der TATA-Box des *Av-shp3*-Promotors und dieser konservierten Sequenz beträgt 490 bp (Abb. 4-10, 4-20); bei *L. sigmodontis* erstreckt sich dieser Abstand jedoch über 2830 bp einschliesslich der Exons 1 und 2 des *Ls-shp3*-Gens (HIRZMANN et al., 2002). Die starke Homologie zwischen den paralogen Genen *Ls-shp3a* und *-shp3* und *Bm-shp3a* und *-shp3* erstreckt sich bis zum Anfang des zweiten Exons (Identität 99% bzw. 98%, Abb. 4-20; vgl. HIRZMANN et al., 2002). Bei *A. viteae* dagegen beschränkt sich die Homologie auf die Promotorregion (90% Identität) und endet ca. 80 bp stromabwärts der TATA-Box (Abb. 4-5, 4-20). Diese Ergebnisse deuten auf



eine Deletion des Kodierbereiches von *Av-shp3* hin und erklären auch die fehlende Kreuzhybridisierung der genomischen *shp3*-Fragmente mit der Sonde aus dem 3'-Bereich von *Av-shp3a* (Abb. 4.1). Die Datenbanksuche in allen sechs Leserastern mit der oben beschriebenen konservierten Sequenz distal des *Av-shp3*-Promoters (Abb. 4-7) ergab keine weiteren signifikanten Homologien. Der GC-Gehalt dieser genomischen Sequenz entspricht mit 29% dem der *Brugia*-Introns (HAMMOND, 1994).

In der genomischen Region zwischen *shp3a* und *shp3* fanden sich bei *B. malayi* und *L. sigmodontis* sieben Abschnitte mit hoher Sequenzhomologie (66%-89% Identität; HIRZMANN et al., 2002). Wegen des erhöhten GC-Gehaltes und der potentiellen Spleiss-Stellen, die nach Prozessierung ein durchgehendes Leseraster ergeben hätten, wurde angenommen, dass diese sieben Abschnitte mehrere Exons eines anderen Gens, welches als *Intergen* bezeichnet wurde, repräsentieren. Weitere Hinweise ergaben sich durch die signifikante Homologie (70% Identität) zwischen dem *Intergen* und einer cDNA-Sequenz aus Männchen von *O. volvulus* (SWOVAMCAQ02E05SK). Mit zwei Primern aus den potentiellen Exons 2 und 7 wurde aus revers transkribierter *A. viteae*-Männchen-Gesamt-RNA mittels PCR ein singuläres, 560 bp grosses cDNA-Fragment mit durchgehendem Leseraster amplifiziert, dessen Sequenz der von der genomischen Sequenz abgeleiteten zu 100% entsprach (Abb. 4-11, 4-12C). Ein Vergleich der abgeleiteten *Av-Intergen*-cDNA und der *Ov*-cDNA aus der Datenbank auf Nukleotid- und AS-Ebene ist in Abb. 4-14 dargestellt und ergab eine Identität von 84% (516/611) bzw. 78% (156/200) und eine Homologie auf AS-Ebene von 87% (175/200)]. Das *Intergen*-Transkript ist, wie für *O. volvulus* anzunehmen, männchenspezifisch, da dieses cDNA-Fragment nicht aus adulten *A. viteae*-Weibchen und -Blutmikrofilarien amplifiziert werden konnte.

Unmittelbar nach dem vermutlichen 3'-Ende der *Av-Intergen*-cDNA folgt in der genomischen *Av*-Sequenz eine potentielle 5'-Spleiss-Stelle (GTTCGT), die auch in den genomischen Sequenzen von *L. sigmodontis* (GTTTGT) und *B. malayi* (GTTAGC) an dieser Position konserviert ist. Somit war die Existenz eines weiteren Exons denkbar, da auch 1240 bp stromabwärts dieser Spleiss-Stelle ein konservierter Bereich von ca. 80 bp bei *A. viteae*, *B. malayi*, und *L. sigmodontis* (Identität bis zu 89%; Abb. 4-20) vorhanden ist. Durch weiterführende Untersuchungen (3' RACE-PCR) bei *A. viteae*, *L. sigmodontis* und *B. malayi* konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Sequenz tatsächlich um das Exon 8 des

*Intergens* handelt (HIRZMANN, Giessen, pers. Mitteilung). Über eine 5' RACE-PCR liess sich das vermutliche Start-Kodon ebenfalls bestätigen (Abb. 4-11).

Bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *Av-Intergens* wurden eine konservierte Nukleosid-Transporter-Domäne und zwei potentielle Transmembrandomänen mit einer konservierten N-Glykosylierungsstelle (NGSI) gefunden. In der Abb. 4-15 sind diese Domänen im Vergleich zum hENT2 (,Human Equilibrative Nucleosid Transporter 2') dargestellt, der aus der Familie der Nukleosid-Transportern am besten charakterisiert ist. Dieser humane Nukleosid-Transporter besitzt 11 potentielle Transmembrandomänen mit zwei konservierten N-Glykosylierungsstellen in der ersten vorhergesagten extrazellulären Schleife (YAO et al., 2002) und zeigt, ähnlich wie das *Intergen* von *A. viteae*, eine geschlechtsspezifische Transkription, wobei grosse Mengen des Transkripts in der Prostata und geringere Mengen in den Hoden, aber kein Transkript in den Ovarien gefunden wurden (Northern-Blot-Hybridisierung; CRAWFORD et al., 1998).

Für das *Intergen* von *A. viteae* wurde bei Weibchen ein *trans*-gespleissstes Pseudotranskript gefunden (Abb. 4-12A). Dieses *trans*-gespleissste Transkript weist aufgrund der Intronsequenz, in der nach einem potentiellen Start-Kodon (ATG) mehrere Stopp-Kodons folgen (Abb. 4-13), kein durchgehender Leseraster auf und wird demzufolge nicht zur Translation eines funktionsfähigen Proteins führen. Es ist auffällig, dass in diesem Intron zwischen den Exons 3 und 4 ein zwischen *A. viteae* und *O. volvulus* hoch konservierter Sequenzabschnitt liegt (90% Identität, Abb 4-13). In der Datenbank wurde ferner ein cDNA-Klon mit SL von *B. malayi* gefunden (Eintrag 10/12/99), der die intergenischen Abschnitte 2 und 3 enthält (mit bis zu 94% Identität zu den Exons 2 und 3 der *Av-Intergen*-cDNA ohne SL) und ebenfalls nach dem *Trans*-Spleiss-, 'Leader' mehrere Stopp-Kodons aus der Intron-Sequenz aufweist. Dieser cDNA-Klon (SWBmAMCAC43E12-5') stammt aus einer konventionell hergestellten cDNA-Bank adulter *B. malayi* Männchen. Solche geschlechtsspezifische Pseudotranskripte besitzen möglicherweise regulatorische Funktionen. Männchen- und Weibchen-spezifische Spleissvarianten, die auf geschlechtsspezifische Faktoren mit Regulation des RNA-Spleissens hindeuten, wurden schon bei der Furin-Protease von *Dirofilaria immitis* beschrieben (JIN et al., 1999).

Anders als bei den Arten mit bescheideten Mikrofilarien, *L. sigmodontis* und *B. malayi*, weist *A. viteae* eine divergente Orientierung der Gene *shp3a* und *shp3* sowie eine Deletion der

Kodierregion von *Av-shp3* auf. Die unterschiedliche genomische Organisation der *shp3a-shp3*-Region bei *A. viteae* führte zur Fragestellung, die Existenz dieser Gene sowie deren Organisation auch bei anderen Arten, die ebenfalls unbescheidete Mikrofilarien freisetzen, zu überprüfen. Von der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* konnten in der Genbank partielle EST-Sequenzen identifiziert werden, die für Homologe der Matrixproteine der Mikrofilarienscheide kodieren. Ein EST-Contig ist homolog zu Shp2 und ein weiteres ist homolog zu den Proteinen der Shp1/Shp1a-Familie. Ein homologes *shp4*-Gen konnte jedoch nicht identifiziert werden (HIRZMANN et al. 2001). Durch Ansequenzierung des Phagenklons  $\lambda$ Av3-1 (Abb. 4-10) wurde 3' stromabwärts des *shp3a*-Gens von *A. viteae* ein weiteres Gen mit Homologie zu *Caenorhabditis elegans* (kodiert für ein hypothetisches Protein C29F5.1) mit mehreren homologen *O. volvulus*-EST-Sequenzen in der Datenbank dargestellt. Die Amplifikation der genomischen *O. volvulus*-Sequenz mit Oligonukleotiden aus den hoch konservierten, flankierenden Genen *OvC29F5.1* (s.u.) und *Ov-Intergen* mit einer anschließenden Klonierung und Sequenzierung resultierten zwar in der Isolierung der flankierenden *O. volvulus*-Gene, aber die dazwischen liegende Sequenz enthielt abweichend von *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *A. viteae* kein orthologes *shp3a*-Gen (Abb. 4-20). Es war jedoch nicht auszuschließen, dass ein *shp3a*-Gen bei *O. volvulus* an einer anderen Stelle in Genom als bei den genannten Arten lokalisiert ist. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass ein orthologes Gen *shp3* stromabwärts des *Intergens* existiert. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurde eine genomische Southern Blot-Analyse mit einer *Av-shp3*-Promotorsonde durchgeführt. Die Promotorsequenz ist bei allen bisher bekannten *shp3a*- und *shp3*-Genen hoch konserviert (vgl. HIRZMANN et al., 2002) (Abb. 4-5). Die *Av-shp3*-Promotorsonde hybridisierte jedoch auch unter den gewählten, wenig stringenten Bedingungen nicht mit Fragmenten von *O. volvulus* (Abb. 4-19). Dieses Ergebnis lässt die Annahme zu, dass die Gene *shp3a* und *shp3* bei *O. volvulus* nicht konserviert sind.

Das zum Phagenklon  $\lambda$ Av3-1 homologe *C. elegans*-Gen *C29F5.1* (Datenbankseintrag: NM\_062866) kodiert für ein Polypeptid von 383 Aminosäuren (Abb. 4-18) und einem Molekulargewicht von 43.3 kDa. Das Protein ist vermutlich im Zytoplasma lokalisiert (PSORT II-Analyse) und sehr wahrscheinlich nematodenspezifisch, weil bisher keine Homologien ausserhalb des Stammes Nematozoa gefunden wurden. Das homologe Gen *C29F5.1* von *O. volvulus* kodiert ebenfalls für ein Polypeptid von 383 Aminosäuren (Abb. 4-17) mit einem Molekulargewicht von 43.2 kDa. Die Transkription von *OvC29F5.1* ist nicht stadienspezifisch, da drei der cDNA-Klone in der Datenbank aus infektiösen Drittlarven, je

einer aus subkutan lokalisierten Mikrofilarien und adulten Weibchen und zwei aus sich häutenden Drittlarven isoliert wurden. Die Funktion des Proteins C29F5.1 ist nicht bekannt und es konnten auch keine funktionellen Domänen bei Datenbanksuchen identifiziert werden. Die enge Kopplung des *C29F5.1*-homologen Gens und dem *Intergen* ist bei den Filarien-Arten mit unbescheideten Mikrofilarien, *A. viteae* und *O. volvulus*, und bei den Arten *L. sigmodontis* und *B. malayi*, die bescheidete Larven freisetzen, während der Phylogenie erhalten geblieben (Abb. 4-20). Während aber bei allen bisher untersuchten Filarien (*L. sigmodontis*, *B. malayi* und *A. viteae*) zwischen dem *C29F5.1*-homologen Gen und dem *Intergen* das *shp3a*-Gen liegt, fehlt dieses bei *O. volvulus*.

Die homologe *shp3a-shp3* genomische Region von *A. viteae* zeigt, wie bei *L. sigmodontis* und *B. malayi*, eine konservierte Syntänie und enge Genkopplung (*shp3a* – *Intergen* – *shp3*) (Abb. 4-20). Anders als bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* weisen die beiden paralogenen Gene *shp3a* und *shp3* bei *A. viteae* eine divergente Orientierung auf. Durch die Analyse der genomischen Sequenz von *A. viteae* wurden signifikante Homologien zwischen den 5'- und 3'-flankierenden, nicht kodierenden Bereichen des *Av-shp3a*-Gens identifiziert, die auf eine Inversion dieses Gens hinweisen (vgl. Kapitel 4.5). In der Phylogenie der Filarien nimmt *A. viteae* offenbar eine Mittelstellung ein, nachdem bei dieser Art, nicht aber bei *O. volvulus* Homologe dieser Gene existieren. Eine Studie zur Phylogenie von Filarien von CASIRAGHI et al. (2001) zeigte, dass phylogenetische, auf den COI (Cytochrome Oxidase Subunit)-Genen basierende Rekonstruktionen mit der Phylogenie der *Wolbachia*-Endobakterien übereinstimmen und die Gruppierung der Nagerfilarie *L. sigmodontis* mit den lymphatischen Filarien *B. malayi* und *Wuchereria bancrofti* sowie die enge Verwandtschaft der unbescheideten Arten *O. volvulus* und *D. immitis* unterstützen. Dieselbe Studie bestätigt jedoch die Sonderstellung der *Wolbachia*-freien Filarie *A. viteae*. Bezüglich der *Wolbachia*-Endosymbionten, die eine wichtige Rolle bei der Embryogenese der Filarien zu spielen scheinen, besteht die Möglichkeit, dass diese in *A. viteae* vorhanden waren und erst während der Phylogenie verloren gegangen sind, denn wie eine aktuelle Studie zeigt, können *Wolbachia*-Bakterien aus *L. sigmodontis* auf *A. viteae* übertragen werden (HARTMANN et al., 2003).

Die Oberflächen uteriner Mikrofilarien von *B. malayi* und *L. sigmodontis* reagieren im IIFT mit Seren aus *W. bancrofti*-infizierten Patienten, nicht aber mit Seren aus *O. volvulus* infizierten Patienten oder *A. viteae* infizierten Hamstern (DIESFELD et al., 1981). Diese

Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikrofilarienscheiden-Oberflächen der verschiedenen Arten kreuzreagierende Epitope besitzen, wohingegen die Mikrofilarienkutikula unbescheideter Arten andersartige Epitope aufweist. Auch die Mikrofilarienoberflächen von *A. viteae* und *O. volvulus* reagieren untereinander nicht kreuz.

Die Transkription von *Av-shp3a* ist wie bei *L. sigmodontis* (vgl. HIRZMANN et al. 2002) weibchenspezifisch und erfolgt sowohl im Uterusgewebe als auch in bestimmten Embryonalstadien. In den Weibchen besteht ein Transkriptionsgradient mit abundanter Transkription in dem Wurmsegment, in dem im Uterus Ring- und Brezelstadien enthalten sind (Segment 2) und mit deutlich schwächerer Transkription im folgenden Segment 3 (Abb. 4-22B). Im vordersten Segment, das reife Mikrofilarien enthält (Segment 1) und im kaudalen Segment 4 fand eine Transkription allenfalls auf niedrigem Niveau statt. Bei den isolierten Embryonalstadien war *shp3a*-Transkript nur in Ring- und Brezelstadien nachweisbar (Abb. 4-22B), d.h. in den für Segment 2 charakteristischen Stadien. Bei gleichen Mengen an Gesamt-cDNA war im Wurmsegment deutlich mehr *shp3a*-Transkript zu finden als in den korrespondierenden Embryonen allein. Es scheint demnach so, dass *Av-shp3a* wie die orthologen Gene von *L. sigmodontis* und *Brugia* spp. im Uterusepithel transkribiert (vgl. HIRZMANN et al., 2002) und exprimiert wird (vgl. SCHARES et al., 1994), und nach Sekretion das Protein auf die Eihüllen der Embryonalstadien aufgelagert wird. Doch ergibt sich mit dem Nachweis des Transkripts auch in intrauterinen Entwicklungsstadien von *A. viteae* ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Arten, denn weder bei *L. sigmodontis* noch bei *Brugia* spp. sind diese Stadien bei der Synthese des Moleküls beteiligt (HIRZMANN et al., 2002). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass bei *L. sigmodontis* die Transkription des *shp3a*-Gens ausschliesslich im apikalen, den ersten 2 cm umfassenden Wurmabschnittes, der gestreckte Mikrofilarien enthält, stattfindet (HIRZMANN et al., 2002).

Zur Gewinnung von *Av-Shp3a*-reaktiven Antisera wurden Kaninchen mit rekombinanten Peptiden aus dem Molekül immunisiert. Die AS-Sequenz der grösseren Peptids *Av-Shp3a*-1p (errechnetes Molekulargewicht von 11.1 kDa), das einen Teil des Ser/Thr-Bereiches enthält, ist in Abb. 4-2 grau hinterlegt und die des kleineren Peptids *Av-Shp3a*-12p (errechnetes Molekulargewicht von 4.8 kDa), das das konservierte Tryptophan-reiche Motiv WWCWW enthält, ist zusätzlich schwarz unterstrichen. Die relativen Molekulargewichte beider rekombinanter Peptide in der SDS-PAGE entsprachen den errechneten Molekulargewichten (Abb. 4-23B). Bei der Auswahl der Peptide waren der hohe Serin/Threonin-Anteil und das

damit möglicherweise verbundene grosse Ausmass an posttranslationalen Modifikationen zu berücksichtigen, wie dies bei dem orthologen Gen von *L. sigmodontis* gezeigt werden konnte (HINTZ et al., 1996). Deshalb wurde für die Herstellung eines Antiserums der nicht-modifizierte C-Terminus des Proteins, der bei den bisher untersuchten Filarienarten (HIRZMANN et al., 2002) und *A. viteae* das hoch konservierte Tryptophan-reiches Motiv enthält, rekombinant exprimiert. Beide Peptide wurden vom Antiserum gegen das klonierte Av-Shp3a-12p-Protein erkannt, womit offensichtlich war, dass die Antikörper gegen den C-Terminus mit dem konservierten Tryptophan-Motiv gerichtet waren, der beiden Proteinen gemeinsam ist. Eine Kreuzreaktivität mit dem ‚6xHis tag‘, der zur präparativen Reinigung der Peptide über eine Ni-NTA-Agarosesäule zum Einsatz kam, wurde durch einen Immunoblot mit drei anderen ‚6xHis tag‘-Proteinen ohne Bezug zu Av-Shp3a ausgeschlossen. Die Immunisierung mit dem grösseren rekombinanten Protein Av-Shp3a-1p hat nicht zum Erfolg geführt, was vermutlich entweder an den Kaninchen, die dafür eingesetzt wurden, oder an der Ausbildung von Dimeren (Abb. 4-23C<sub>1</sub> bzw. C<sub>2</sub>) lag. Die starke Neigung zur Dimer-Bildung basiert vermutlich auf den drei Cysteinen in der AS-Sequenz, die möglicherweise an kovalenten intermolekularen Disulfid-Brückenbildungen beteiligt sind.

Av-Shp3a konnte allerdings mit dem Antiserum gegen das Peptid Av-Shp3a-12p im Immunoblot unter herkömmlichen Bedingungen weder in *A. viteae*-Männchen und -Weibchen noch in Mikrofilarien nachgewiesen werden. Erst unter Zusatz von CHAPS zum Transferpuffer liess sich ein reaktives 22 kDa-Protein in Weibchen und Gesamt-Embryonalstadien aufzeigen, das als Av-Shp3a angesehen wurde, nicht jedoch in Blutmikrofilarien und Männchen. Der Zusatz vom zwitterionischen Detergenz CHAPS führt zur Wiederherstellung der Antikörper-Bindungsfähigkeit von membranständigen Oberflächenproteinen mit hydrophoben Bereichen (MANDRELL & ZOLLINGER, 1984). Obwohl die C-terminale Region von Av-Shp3a keine klassische Transmembran-Domäne aufweist, enthält sie viele hydrophobe AS wie durch eine Hydrophobizitätsanalyse nach HOPP & WOODS (1981) dargestellt werden konnte (Abb. 4.29). Die stärkste Reaktion war mit Gesamt-Embryonalstadien zu finden (Abb. 4-30D), wo auch ein etwas grösseres Protein schwach mit dem Antikörper reagierte. Es beruhte möglicherweise auf unterschiedlichen Modifikationen ein und desselben Proteins, die zu einer unterschiedlichen Grösse in der SDS-PAGE führten. Av-Shp3a konnte unter den gleichen Bedingungen nicht im apikalen, den ersten Zentimeter umfassenden Wurmabschnitt adulter *A. viteae*-Weibchen, der ausschliesslich aus der Eihülle geschlüpfte Mikrofilarien enthält (Abschnitt I in Abb. 4-30D)

nachgewiesen werden, was auch in Übereinstimmung mit dem Fehlen des Proteins in Blutmikrofilarien steht. Eine deutliche Reaktion mit dem 22 kDa-Protein war im letzten Wurmabschnitt, der sich 2.5 cm vom apikalen Ende bis zum kaudalen Ende des Wurmes erstreckt (Abschnitt V in Abb. 4-30D) zu finden. Dieser Bereich enthält auch Ring- und Brezelstadien, wo *Av-shp3a* sogar am stärksten transkribiert wird (Abb. 4-22B). Mit dem Nachweis des Proteins in diesem Wurmabschnitt ergibt sich ein wesentlicher Unterschied zu *L. sigmodontis*, wo Shp3a nur im apikalen, den ersten 2 cm umfassenden Wurmabschnitt, der gestreckte Mikrofilarien enthält, nachzuweisen war (SCHARES et al., 1994). Ob *Av-Shp3a* auch im kaudalen Wurmbereich exprimiert wird, der multizelluläre Stadien und Oozyten enthält, konnte aufgrund der gewählten Abschnitte zur Antigengewinnung (vgl. Kapitel 3.2.3) nicht ermittelt werden, aber die Transkription des Gens findet dort, wie bereits dargestellt wurde, vergleichsweise auf schwachem Niveau statt (Abb. 4-22B).

Aus der Position von *Av-Shp3a* nach PAGE (22 kDa) und dem berechneten Molekulargewicht von 12.04 kDa ergibt sich, dass etwa 45 % der Masse von *Av-Shp3a* durch posttranslationale Modifikationen zustandekommen. Auch die homologen Proteine von *L. sigmodontis* und *B. malayi* sind in hohem Mass posttranslational modifiziert; bei *Ls-Shp3a* beträgt der Anteil der Modifikationen nach MALDI-TOF-Massenspektrometrie sogar 75 % der Molekülmasse (ZAHNER et al., 1995; HIRZMANN et al., 2002). Bei *Ls-Shp3a* ist hierfür hauptsächlich phosphatgebundenes Dimethylaminoethanol (DMAE) verantwortlich (HINTZ et al., 1996). Im Gegensatz zu *L. sigmodontis* lässt sich in *A. viteae*-Extrakten biochemisch kein DMAE nachweisen (HINTZ, Giessen, pers. Mitteilung). Folgerichtig schlug in der vorliegenden Arbeit auch der Versuch fehl, in *A. viteae*-Extrakten DMAE über einen Immunoblot unter Verwendung eines DMAE-spezifischen Antikörpers nachzuweisen. DMAE-Phosphat ist im Falle von *L. sigmodontis* in der Serin/Threonin-reichen Domäne von Shp3a gebunden (HINTZ et al., 1996), die 56 % der Aminosäurekette ausmacht (HIRZMANN et al., 2002). Alternativ war als Substituent Phosphorylcholin (PC) in Frage gekommen, das bei Helminthen insgesamt in Form PC-haltiger Glycoproteine häufig nachgewiesen wurde, wobei wobei PC an N-glykosilierte Glykane gebunden ist (HASLAM et al., 1999). Der Bereich zwischen 21 und 24 kDa des Proteinextraktes adulter *Av*-Weibchen reagierte im Immunoblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen PC-Epitope (Abb. 4-31), so dass eine solche Modifikation bei *Av-Shp3a* (22 kDa) möglich erscheint. Das ‚reife‘, abgeleitete Polypeptid besitzt auch fünf potentielle N-Glykosilierungsstellen an den Positionen 25, 33, 41, 49 und 79 (Abb. 4-2), die mit dem Programm NetNGlyc 1.0 von CBS ermittelt wurden und alle über

dem Schwellenwert von 0.5 lagen. Vier dieser N-Glykosilierungsstellen befinden sich jeweils in den nahezu identischen repetitiven Peptiden.

Ein Nachweis von *Av-Shp3a in situ* gelang im IIFT mittels des Antiserums gegen das rekombinante Peptid aus dem C-Terminus des Moleküls nicht. Die Epitope sind offensichtlich nicht zugänglich. Für Shp3a und Shp3 von *L. sigmodontis* und *B. malayi* nehmen HIRZMANN et al., (1995) an, dass sich der hydrophobe C-Terminus der Moleküle in der Scheidenmatrix, die hauptsächlich aus kovalent gebundenen Shp2-Molekülen besteht, verankert. Die Tryptophan-reiche Domäne könnte über hydrophobe Wechselwirkungen an kurze Prolin-reiche Peptide, die sich in den repetitiven Motiven des Hauptstrukturproteins Shp2 befinden, und Disulfidbrücken (die Cysteine sind auch auf den C-Terminus beschränkt) binden (vgl. HIRZMANN 1997). Der misslungene Versuch Mikrofilarien mittels Anti-*Av-Shp3a-12p* zu agglutinieren, hätte in diesem Sinne interpretiert werden können, wäre *Av-Shp3a* in/an Mikrofilarien nachweisbar gewesen. Letzteres war jedoch weder immunhistologisch noch per Immunoblot möglich.

Ob Wirte im Verlauf einer *A. viteae*-Infektion mit *Av-Shp3a* konfrontiert werden, lässt sich nicht eindeutig sagen, nachdem Seren von infizierten *M. coucha* zwar ein Protein von ca. 22 kDa erfassten (Abb. 4-32), aber nicht mit den rekombinanten Peptiden reagierten. Grundsätzlich verneint werden kann die Frage bei diesen Ergebnissen allerdings nicht. Es könnte durchaus so sein, dass mit bei der Freisetzung der Mikrofilarien nur Fragmente von *Av-Shp3a* ausgeschieden werden, d.h. möglicherweise nicht der intakte C-Terminus des Proteins. Ein eventuelles Ausbleiben von Antikörpern gegen *Av-Shp3a* in infizierten Wirten dürfte aber wohl nicht in dem Sinn verstanden werden, dass diese eine Voraussetzung für eine Persistenz der Mikrofilarien ist. Ein solcher Zusammenhang wird zwar bei *L. sigmodontis*-Infektionen angenommen (SCHARES et al., 1994; HIRZMANN et al., 2002), wobei allerdings nicht die Aminosäurekette das entscheidende Antigen enthält; dieses wird vielmehr von der nach aussen gerichteten Modifikation DMAE-Phosphat repräsentiert.

Zusammenfassend ist nicht davon auszugehen, dass *Av-Shp3a* wie die homologen Proteine aus *L. sigmodontis* und *B. malayi* eine wichtige immunmodulierende Funktion hat. Die biologische Funktion von *Av-Shp3a* ist möglicherweise in der Abundanz des Proteins in Embryonalstadien zu suchen: *Av-Shp3a* könnte als Muzin-ähnliches Protein eine Art Gleitmittel, sog. ‚Lubrikant‘, bilden, das die Verklumpung der zahlreichen, sich dicht gepackt



im Uterus entwickelnden Embryonen verhindert. Im Uterusepithel adulter weiblicher Pärchenegel (*Schistosoma mansoni*) wird z.B. ebenfalls ein Muzin-ähnliches Protein, genannt A11, exprimiert, das reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin ist und dessen zentrale Threonin-reiche Region Sequenzhomologien zum humanen MUC2 aufweist (MENRATH et al., 1995); die Autoren vermuten, dass die biologische Funktion des Proteins A11 darin besteht, eine Art protektive Schicht für den Reproduktionstrakt weiblicher Pärchenegel zu bilden.

6.

**ZUSAMMENFASSUNG**

Innerhalb der taxonomischen Superfamilie der Filarien (Filarioidea) besteht für die ersten Larven, die Mikrofilarien, eine Dichotomie: Bei den Erregern der lymphatischen Filariose des Menschen, *Wuchereria bancrofti* und *Brugia* spp., sowie einigen tierspezifischen Gattungen, z.B. *Litomosoides*, sind die Mikrofilarien von der modifizierten Eihülle, einer sog. Scheide umgeben, während bei anderen Filarien, so der veterinärmedizinisch wichtigen Art *Dirofilaria immitis* beim Hund, der experimentell-parasitologisch häufig eingesetzten Nagerfilarie *Acanthocheilonema viteae* und *Onchocerca volvulus*, dem Erreger der menschlichen Flussblindheit die Mikrofilarien im Uterus die Eihülle verlassen und unbeschiedet freigesetzt werden. Im ersten Fall ist die Scheide – eine die Larve lose umgebende Hülle – wegen ihrer geringen Durchlässigkeit die eigentliche Interaktionsfläche mit dem Immunsystem des Wirtes, im anderen Fall ist es die Kutikula der Mikrofilarie.

In den vergangenen Jahren wurden sechs Hauptproteine der Mikrofilarienscheide von *L. sigmodontis*, Shp1, Shp1a, Shp2, Shp3, Shp3a und Shp4 sowie ausser Shp4 ihre Orthologe bei *Brugia* spp. auf molekularer Ebene charakterisiert und in ihrer Genese im Zuge der embryonalen Entwicklung dargestellt. Die hoch konservierten, Muzin-ähnlichen Proteine Shp3a und Shp3 wurden als Hauptbestandteile der Mikrofilarienscheiden-Oberfläche identifiziert. Sie sind ein Produkt des Uterusepithels des weiblichen Wurms und spielen offensichtlich eine wichtige Rolle in der Evasionsstrategie des Parasiten, da parasitämische Wirte keine Antikörper gegen sie bilden. Im Zusammenhang mit der Dichotomie bei der Scheidenbildung erhob sich die Frage, inwieweit Shp3a und Shp3 auch bei *A. viteae* und *O. volvulus* konserviert sind, die scheidenlose Mikrofilarien freisetzen.

Das *A. viteae*-Genom enthält eine homologe *shp3a-shp3*-Region. Sie zeigt wie bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* eine konservierte Syntanie und enge Genkopplung, aber anders als bei *L. sigmodontis* und *B. malayi*, bei denen die Gene in einem Tandem organisiert sind, weisen die beiden paralogen *A. viteae*-Gene *shp3a* und *shp3* eine divergente Orientierung auf. Analysen der genomischen Sequenz von *A. viteae* deuten auf eine Inversion des *Av-shp3a*-Gens hin; zudem ist die Kodierregion von *Av-shp3* deletiert.

*Av-Shp3a* ist ein sekretorisches, Muzin-ähnliches Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 12.04 kDa, dessen Aminosäuresequenz, wie bei Shp3a und Shp3 von *Brugia* spp. und *L. sigmodontis* in drei Abschnitte unterteilt werden kann: eine sekretorische Standard-Signalsequenz, eine Serin/Threonin-reiche Region mit fünf potentiellen N-

Glykosilierungsstellen und eine hydrophobe C-terminale Region, die ein besonders auffälliges, bei allen untersuchten Spezies konserviertes Tryptophan-reiches Motiv (WWCWW) beinhaltet.

3'-stromabwärts des *shp3a*-Gens von *A. viteae* wurde ein weiteres Gen mit Homologie zu einem *Caenorhabditis elegans*-Gen, das für ein hypothetisches Protein C29F5.1 kodiert, mit mehreren homologen *O. volvulus*-EST-Sequenzen in der Datenbank identifiziert. Die Amplifikation der genomischen *O. volvulus*-Sequenz mit Oligonukleotiden aus den hoch konservierten, flankierenden Genen *OvC29F5.1* und *Ov-Intergen* (dieses Gen besitzt in *A. viteae* geschlechtsspezifische Splicevarianten und eine konservierte Nukleosid-Transporter-Domäne) und eine anschließende Klonierung und Sequenzierung resultierten zwar in der Isolierung der flankierenden Gene, aber die dazwischen liegende Sequenz enthielt abweichend von *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *A. viteae* kein orthologes *shp3a*-Gen. Die Promotorsequenz ist bei allen *shp3a*- und *shp3*-Genen hoch konserviert. Über eine Länge von 198 bp besteht unter den 6 Promotor-Sequenzen von *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *A. viteae* eine aussergewöhnlich hohe Identität von 75%. Eine *Av-shp3*-Promotorsonde hybridisierte unter den gewählten wenig stringenten Bedingungen im Southern Blot jedoch nicht mit Fragmenten von *O. volvulus*. Dieses Ergebnis lässt die Annahme zu, dass die Gene *shp3a* und *shp3* bei *O. volvulus* nicht konserviert sind.

Die Transkription von *Av-shp3a* erfolgt sowohl im Uterusgewebe als auch in den intrauterinen Ring- und Brezelstadien. In den Weibchen besteht ein Transkriptionsgradient mit abundanter Transkription in dem Wurmsegment, in dem im Uterus Ring- und Brezelstadien enthalten sind. Hiermit stellt sich ein Unterschied zu *L. sigmodontis* dar, bei dem die Transkription und Expression des *shp3a*-Gens ausschliesslich im Uterusepithel des apikalen Wurmabschnittes, der gestreckte Mikrofilarien enthält, stattfindet. Das *A. viteae*-Protein konnte mittels eines polyklonalen Antiserums gegen ein rekombinantes Peptid aus dem *Av-Shp3a*-C-Terminus im Immunoblot in *A. viteae*-Weibchen, Gesamt-Embryonalstadien sowie im Wurmabschnitt, der sich 2.5 cm vom apikalen bis zum kaudalen Ende erstreckt und auch Ring- und Brezelstadien enthält, erst nach Zusatz von CHAPS zum Transferpuffer nachgewiesen werden. Blutmikrofilarien und Männchen enthielten kein nachweisbares *Av-Shp3a*. Das Protein konnte jedoch weder in Gefrierschnitten noch in fixierten Präparaten immunhistologisch erfasst werden.

Aus der berechneten molekularen Masse der Peptidkette von 12.04 kDa und dem gelelektrophoretisch bestimmten Molekulargewicht von 22 kDa lässt sich auf erhebliche posttranslationale Modifikationen schliessen. *Av-Shp3a* trägt kein Phosphat-gebundenes

Dimethylaminoethanol, das bei den orthologen *L. sigmodontis*- und *B. malayi*-Proteinen die Hauptmasse der Modifikationen darstellt, könnte aber nach Untersuchungen mit einem Phosphorylcholin (PC)-spezifischen Antikörper PC enthalten. Die Bildung von Antikörpern gegen *Av-Shp3a* in *A. viteae*-infizierten Nagern ist wahrscheinlich, konnte jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen nicht annehmen, dass *Av-Shp3a* eine Rolle in der Evasionsstrategie der Mikrofilarien spielt, wie dies für die homologen Proteine aus *L. sigmodontis* und *B. malayi* gilt. Die biologische Funktion von *Av-Shp3a* ist möglicherweise in der Abundanz des Proteins in Embryonalstadien zu suchen: *Av-Shp3a* könnte als Muzin-ähnliches Protein eine Art Gleitmittel, sog. ‚Lubrikant‘, im Uterus bilden.

## 7.

**SUMMARY**

Microfilariae of several filarial genera of the superfamily Filarioidea, e.g. the causative agents of human lymphatic filariasis *Wuchereria bancrofti* and *Brugia* spp. as well as animal-specific genera like *Litomosoides* are completely enclosed by an antibody impermeable modified eggshell, the so-called microfilarial sheath. In other genera, e.g. the rodent filaria *Acanthocheilonema viteae*, which is frequently used as model parasite, *Onchocerca volvulus*, the causative agent of river blindness in man and *Dirofilaria immitis*, an important pathogenic filaria in dogs the larvae hatch from the eggshell during their intrauterine development and are released sheathless. Thus, the host-parasite interface in the first cases is the sheath surface, whereas in the latter cases it is represented by the larval cuticle.

Six major microfilarial sheath proteins of *L. sigmodontis* (Shp1a, Shp1, Shp2, Shp3a, Shp3, and Shp4) and, except Shp4, their orthologues from *B. malayi* have been recently characterized at the molecular level, and with emphasis on their expression sites within the female parasite. Shp3a and Shp3 were identified as mucin-like sheath surface proteins which are highly conserved. These surface antigens are a product of the uterus epithelium and with high probability are involved in the immune evasion of the larvae since they are not recognized in microfilaraemic hosts. The present studies should evaluate whether Shp3a and Shp3 are also conserved in filariae which release unsheathed microfilariae as *A. viteae* and *O. volvulus*.

The genome of *A. viteae* contains a homologous *shp3a-shp3* genomic region. It reveals a conserved synteny but the orientation of the paralogous genes *shp3a* and *shp3* is divergent, whereas in both genera, *Brugia* and *Litomosoides*, the *shp3a* and *shp3* genes are arranged in tandem. Analyses of the genomic *A. viteae* sequence indicate the inversion of the *shp3a* gene and the deletion the coding region of *shp3*.

*Av-shp3a* encodes a secreted, mucin-like protein with a calculated molecular weight of 12.04 kDa. The deduced polypeptid chain shows a domain structure similar to that of Shp3a and Shp3 of *Brugia* spp. and *L. sigmodontis*: a signal peptid sequence, a Ser/Thr-rich domain with 5 potential N-glycosylation sites, and a hydrophobic C-terminal domain with a conserved tryptophan-rich motif WWCWW.

Next to the *shp3a* gene of *A. viteae* a gene was identified with significant homology to a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a hypothetical protein (C29F5.1) as well as to several homologous *O. volvulus* ESTs in data banks. Amplification of the *O. volvulus* genomic

sequence using primers corresponding to the highly conserved flanking genes, C29F5.1-homologue and intervening gene (in *A. viteae* with sex-specific splice variants and conserved nucleoside transporter domain) with subsequent cloning and sequencing resulted in the isolation of the flanking genes but in contrast to *L. sigmodontis*, *B. malayi* and *A. viteae* no *shp3a* homologue could be detected between them. The core promotor sequence of all *shp3a* and *shp3* genes is highly conserved. It encompasses 198 bp with an unusually high similarity of 75 % identical residues between the six promoter sequences of *L. sigmodontis*, *B. malayi* and *A. viteae*. Genomic Southern blot analysis using a DNA probe from the *shp3* core promoter sequence of *A. viteae* revealed with the selected low stringency conditions no homologous sequences in *O. volvulus*. These results suggest that the genes *shp3a* and *shp3* are not conserved in *O. volvulus*.

*Av-shp3a* is transcribed in the uterus wall as well as in the intrauterine developmental ring and bretzel stages. In female worms, there is a transcription gradient with abundant transcription in the worm segment with the uterus containing ring and bretzel stages. This is a significant difference to *L. sigmodontis* where transcription and expression of *shp3a* is limited to the terminal uterus part containing stretched microfilariae.

The protein *Av-Shp3a* could be demonstrated by immunoblotting using a polyclonal antiserum against one recombinant peptide derived from the C-terminal region of the molecule only after adding CHAPS to the transfer buffer. The protein migrates to a 22 kDa position and occurs in females, intrauterine embryonal stages and in the female worm part containing ring and bretzel stages. *Av-Shp3a* could not be detected in blood microfilariae and male worms. However, we failed to identify the protein by immunohistological methods in cryosections and paraffine sections.

A considerable proportion of the *Av-Shp3a* molecular mass is due to post-translational modifications, as estimated from the calculated and SDS-PAGE determined molecular mass. *Av-Shp3a* does not contain detectable phosphate-bound Dimethylaminoethanol, which constitutes the main part of the modifications of the orthologous *L. sigmodontis*- and *B. malayi*-proteins. However, it possibly bears phosphorylcholin (PC) modifications.

In conclusion, *Av-Shp3a*, a mucin-like protein, does not seem to play a role in the evasion strategy of the microfilariae as it is suggested for the homologous proteins of *L. sigmodontis* and *B. malayi*. Its biological function rather could be to act as a lubricant allowing the intrauterine passage of the embryonic stages.

8.

ANHANG

**8.1 Im Vorfeld dieser Arbeit sequenzierter, genomischer Bereich von *A. viteae* (Av3a; 1650 bp) mit dem orthologen *Av-shp3a*-Gen**

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde das *shp3a*-Gen von *A. viteae* durch PCR mit den Primern Pro1 (komplementär zu der stark konservierten Promoterregion der *shp3/3a*-Gene von *L. sigmodontis* und *B. malayi*; Abb. 8-2) und WCW3 (aus der Kodierregion des bei *L. sigmodontis* und *B. malayi* konservierten Tryptophan-reichen Motivs WWCWW; Abb. 8-2) amplifiziert und anschließend sequenziert (HIRZMANN & ZAHNER, 2000). Für die Amplifikation des 5'-Endes der *Av-shp3a*-cDNA wurde der *Trans*-Spleiss-,Leader'-Primer (SL1) und der spezifische Antisense-Primer WCW3 verwendet. Um ein 3'-Ende der *Av-shp3a*-cDNA zu bestimmen wurde eine PCR, wiederum mit revers transkribierter *A. viteae*-♀ polyA<sup>+</sup>-RNA, mit den Primern Av3-3 (Abb. 8-2) und (dT)<sub>21</sub>-Sal/Xho durchgeführt (Oligonukleotid-Sequenzen vgl. Tabelle 3-1). Nach Restriktionsspaltung, Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte konnte eine Sequenz von 1650 bp zusammengestellt werden (Abb. 8-1 und 8-2).

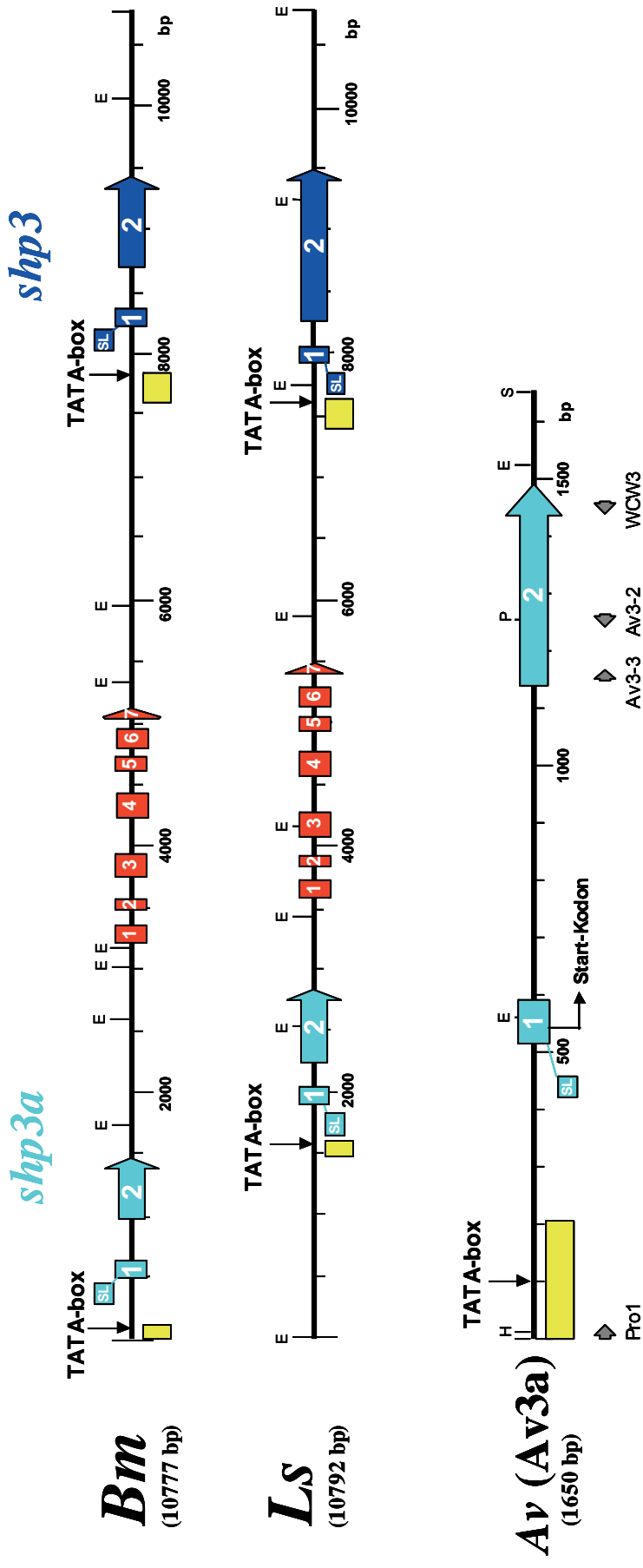
Auf diese Sequenz (Av3a) konnte zu Beginn dieser Arbeit zurückgegriffen werden.

**Abbildung 8-1: Av3a-Sequenz (1650 bp) mit dem orthologen *Av-shp3a*-Gen; die Restriktionskarte, die genomische Organisation und die zur Amplifikation verwendeten Primer sind maßstabsgerecht in Abb. 8-2 dargestellt.**

```

TTGCTTTCCTGAAGCTTTCGGATGAGTAGTGCTATTTCAAAGGCAATGCTTACATTCAATTCAATTGTATTACTC
CACAAGTGCAAAATAATTTCTATATAATAAATGTCTTCAAGTTTTTCAGTACATTTCGCATGATGTTTCGGCCCAAC
AGCAATTTCTGGCATATTTCAATCGAAGTGGAATTTAAATACCAAATGCTTCATCGGTTTTTACCATACATTACAA
GAAAAGGATAGGCGCATATCTTTCTTCTTTCCAAATGTTGTGCAAAATGAGAGTTTGCTTGAAAATGGGAAGCGG
GTCAAGTAAAATCTAATTTATTGCCATAGAAAAGTAAACAGAAAAGTTTCATTAAACTTAAACACAAAGGATTTCA
TAAATTATACTGAATTAATGGCAAATAGGAAAGTAATTTAATGTTATGCAAATCGGAATTTGAGTAATTAATAA
TTTGTCTTAATCATTGTTTTAATAATTAATGATTTTATCTATAAATATTGCTTTTATATTTAGCCTGGACTCGA
TCGATCAAATTAACGATGAAAACACAAAGATTGGAATTCGTTATCATTGCTTTTATTGTGTTTTACGTAATTTA
TTCAATTTTCATTTTCGTTTCGACAACATTTTTATTTTAGAATTTTAGCGACTAGCTATTTATATTCATAGCATATC
ATTAACCTGAATATTGAAATGAAAAAATTAGACTCTCAGCTAATTTTTTCAAACCATTTACTCTTCACTCTCAAC
CACATTGCTCCATAAGAATAAATTAGAATCTTCTGATAAAAGCAATGAATTAAGCATGAGGAAGGAAAGGATTG
AAATTTACTCCAATCTGAAATATTCGCTAAATGAAATGATACATTTTTTGCAGTATTTCGGATATTTGTCTAAAT
TTTCACTAATTTATTTCTTTTCATATACAAATCACTACTATTTCTTTGTTAATTTAACAAAACCTTCGGATAAGAAAT
TAAAAATTTTCAAACCTACCCGCATTATTAGTGTCAGTAGGTGAAATAGACAACAGAAAAAGAAATAGAATTTTCAT
CTCTTCTAATTTATTTTCTTGACAATTTTTTTTTATCAATAATTTTCCAATATTCCTATTATATTCACGTCTAACA
ATATATTATTATAGCCTTATGCGTCACAAAGCAGCAATTCAACAACACCAATAACGTCAAACCTTCACAACACCAA
TAACGTCAAACCTCCACAACACCAATAACGTCAAACCTCCACAACCTTCAGAATCTGCAGTAACGACAGCTTTTTCGT
TAACTACAACCTTCTCCATCAATTGAACTATTTTTTACCTCAACAGTTAATGATTCAACAACAAAAGCAACTTTGG
AAACGACAACCTTCAACACCAATCCTTCGAACTACATCATCTGTGCTTTTAAACGTCAAACCTCCTCAACCAGGAAAAC
TCTATTTCTGCTATTGGTGGTGGTGGTGGTATCCAACAAATGCCGTTTATTTATGGAATATGTGAAATTCGGATT
ACATGTATGTATTGAACCTGTGGAATTCATTGTTACATAGTATTTCTGGAATTTATTCAACTTCCTTTATAATT
GAACATTGTAAACAATCGAATGATCAATCGATTGAGTAATACTTCAAGAGTTATTACCCCTTTTGATGTGCGAC

```



**Abbildung 8-2: Homologievergleich der *shp3/3a*-genomischen Regionen von *B. malayi* und *L. sigmodontis* sowie Restriktionskarte und genomische Organisation der genomischen *A. viteae*-Sequenz (Av3a) von 1650 bp mit dem orthologen *Av-shp3a*-Gen.**

Die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *PstI* (P) und *SalI* (S) sind eingezeichnet. Die Position und Orientierung der Primer Pro1, Av3-2, Av3-3 und WCW3, die für die Amplifikation der Av-Sequenz Av3a verwendet wurden, sind durch graue Pfeile dargestellt. Die Exons der entsprechenden Gene sind in den Restriktionskarten mit farbigen Boxen eingezeichnet, wobei das letzte Exon als Pfeil die Orientierung vorgibt. In der genomischen Region zwischen *shp3a* und *shp3* finden sich bei *B. malayi* und *L. sigmodontis* sieben Abschnitte (1-7, rote Boxen) mit hoher Sequenzhomologie (66%-89%; HIRZMANN et al., 2002). Mit gelben Boxen ist die hochkonservierte *shp3/3a*-Promotorregion hervorgehoben. Die Position der potentiellen TATA-Boxen und des Start-Kodons bei *A. viteae* sind angegeben.



## 8.2 Die Nukleotidsequenz des *shp3a-shp3*-Genomabschnittes von *Acanthocheilonema viteae*

Die Abbildung 8-3 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte, genomische *shp3a-shp3*-Sequenz von *A. viteae*. Eine Sequenzlücke von ca. 4.6 kB zwischen den Nukleotiden 945 und 960 ist durch fünfzehn Kleinbuchstaben g markiert. Durch einen kursiven Fettdruck sind, wie folgt, das erste Exon von *AvC29F5.1*, das zweite und erste Exon sowie die TATA-Box-Sequenz des *Av-shp3a*-Gens, die sieben Exons des *Av-Intergens* und die TATA-Box-Sequenz des *Av-shp3*-Promotors hervorgehoben; die Restriktionskarte und die genomische Organisation sind maßstabsgerecht in Abb. 4-10 und 4-20 dargestellt.

**Abbildung 8-3: Die genomische *shp3a-shp3*-Nukleotidsequenz von *A. viteae*.**

```

1  GATCAATTTTATATTTGAATGCATTTTGCATAGAAATATTGGTTATATTATGAGTTTAAAC
61  TTCTACATGGGAAATGTAAGAACCATTTTTTTACTTTTTAAAAAAATTCTAAATCTTCA
121 TATTTCTCGAAAAATTCGGTCCATTAAGCATTGTTAGTTAAACAATCTTTACTGATTATTC
181 GTTATATGCTGCCTTATTTACTTTTCATTGCTTGAAAAATATGAAACGTTATTTTGGTGTG
241 ATATTTTGGAGAGAAAACTATCGAAATGTAGGGAAGTTATATGATATATCCTATAAGTGG
301 GAAGAAGAGAGAGAGGGAGAGAAAAGAGAAAAGAAAGAAGTCAAATACGGAAGTGTGATGTA
361 GAGAGAATTTTTTCGCATAAATAATGCTAAGTAATGTCCTTTTTTTAACTTATTTTCCTCC
421 GCTTTTATGTTGTTTTTCAACAAAAGCTGATTCATTAAAATCTCGATGAAATATTTTCA
481 ATCAGTGGAAAAAAACTTCTCGCTTGTGACATATAAGATTCAAGAATCAAGAAAAGCA
541 AGCCTTCAGCCCTCAAGAAGTAATGTCAGCTGAAGGATTTTGGTTATTTGATGGTTTGA
601 AGAAGAACCATATGGCCTTTTACCGCTTGTGAATTTATCTGGAAAAGGTGGACCGACATC
661 CACGAAATTTGTGGAAGAATTGGCTCATATCAATGGTATTTGAATGACGAGACACCTAC
721 CATCGTTGTAAGTTTTTATCATTTTTTCAGAAATAAATAATCTGATTTAAACAATAAATA
781 TATTAATTGTTTTATGAACGGTCAACACATATACAGTAATTTTTAATTGAGTGTA AAAAT
841 TTATTACAAATTTCTTTTCATTTTCATTGAAGTTTTTCATTTTGCAGTGGGTAATAACGCTAT
901 ATTTTGCAGTCTAATTAGACTGCTGAAGTGATTAATTGGTAGTCAggggggggggggggggg
961 AACTAGCAAATTTCTCATCATAAAAACCATTCCATATCTAAATGTCCATCGAAATATTTCT
1021 GTCTCGTTCTCAAATAAAATCCAATCACATGATTAATCTTATAATCCGCTGGTTTTATGTT
1081 TAACATTTTTTTTTATAAAAACATTCTTTCCCATGGCTATCTTTGCAACTAAACAAACTGC
1141 ATCGCAACACTCCCATTAATTCATTCTGTGTAAGAATTTAAATGCATCCAAAATTTCTC
1201 ATGATCAAGCGGAAATCACGAGCTCGCATTCTCGCCCCGCATTATCTATTCATTCTCAA
1261 TCATTTTCATTATTGTTATCGAAATTATTCTCACAAATTTCCGAACAAAAGGAAATAAAT
1321 CTTCAAATTTTCATGCAAATCAATAACTCAATCAATCGTTTCCAACACAAAGCTATTCTC
1381 TAAATTGCACTAATGACAGGAAGGTTTCGTGACGGACATTCTTGAATTATGGAGGATAAGA
1441 AACGGATTAGAAGTAGTCATGACGTACACATCAAATTTAAAAGTATTTGATAGTATTTCTG
1501 AATTGATTACCTTATTTAAATTATTCACTTTTTTGCATTTTTTCCACTTTTAATTTCTTG
1561 ATGCTGGGAAAAACCAGAATTAGTTAGCAGTAGCAAAACGACGAGAGATGCCTAATTCAC
1621 ATTGAACATAAATATAAAAGGAAAATTTCAAGAGAAAGTCAAAAAGATGAATTTTTTTTG
1681 TGAGTTCTGTTACATTATTTAATCTTATTTTATTTTGTAAAGCAGAAATTTCTACTGAATC
1741 AAAACACAGTCTTCGAAATGACGGCCTTTAATGACTAAGAAGTCTTTCGAGAAAGCACA
1801 ACATATTATTGATGTCATTCAAATTTTTGTACTTTAAAAGATTTTATTCAAGTTTAGAC
1861 ATAACATTTATGTTTACAAAAATGGTAATCATCTGAAACATAATTTTATTCTTTCTTCTA
1921 AACTTTACGAAAAAGATCGACTGTTTGGGAACATTTCGACGATACATAAATTGTAATAGAG
1981 GAACCTCTTCCTGGAAATATTCGTCTTCTCATTAATAATTATACTTTAGTTAGTACATGAAA
2041 ATAGATAAATAGATAGGTATTTATATATTGCACTAAACTTCTGCGTTAAAAAGTTTCAGTT
2101 TGATGAATAATGTTAAAAAGAAATTCATATGAACGAAATTACATCACTTATATGCGCAAAA
2161 ATAAATACTTATTGATTAATAAGAATTTGACAATTATCAGAGAGTTGGAATTCAAAACAAA
2221 AAAGGACGGAATTTAAAAATGAAGTTATTTTCCATCAGAATGCAAATATTAACCAATACA
2281 AATTTATTTTTTTTTATATTTTTTCAACGCTCATAACAATCTTTTAAGTCGACATCAAAAGG

```

2341 GGTGAATAACTCTTGAAGTATTACTCAATCGATTGATCATTGATTGTTTTACAATGTTC  
2401 AATTATAAAGGAAGTTGAATAAATTCAGAAATACTATGTGAACAATGAATTCACAGGT  
2461 TCAATACATACATGTAATCCGAATTT**TCACATATTCCATAAAATAAACGGCATTGTGGAT**  
2521 **ACCACCAACACCACCAATAGCAGAAATAGAGTTTTCTGGTTGAGGAGTTGACGTTAAAA**  
2581 **CGACAGATGATGTAGTTTGAAGGATTGGTGTGAAAGTTGTCGTTTCCAAAGTTGCTTTTG**  
2641 **TTGTTGAATCATTAACTGTTGAGGTAAAAATAGTTTCAATTGATGGAGAAAGTTGTAGTTA**  
2701 **ACGAAAAAGCTGTCGTTACTGCAGATTCTGAAGTTGTGGAGTTTGACGTTATTGGTGTG**  
2761 **TGGAGTTTGACGTTATTGGTGTGTGAAGTTTGACGTTATTGGTGTGTGTAATTGCTGC**  
2821 **TTTGTGACGCATAAGG**CTATAATAATATATTGTTAGACGTGAATATAATAGGAATATTGG  
2881 AAAATTATTGATAAAAAAATTGTCAGAAAAATAAATTAGAAGAGATGAAATTCATTCT  
2941 TTTTCTGTTGTCTATTTACCTACTGACACTAATAATGCGGGTAGTTTTGAAAAATTTTA  
3001 ATTTCTTATCCGAAGTTTTGTTAAATTAACAAAGAAATAGTAGTGATTTGTATATGAAAG  
3061 AAATAATTAGTGAAAATTTAGACAAATATCGGAAATCAGTGCAAAAATGTATCATTTTCAT  
3121 TTAGCGAATATTTTCAGATTGGAGTAAATTTCAATCCTTTCTCTCATGCTTTAATTCA  
3181 TTGCTTTTATCAGAAGATTCTAATTTATTCTTATGGAGCAATGTGGTTGAGAGTGAAGAG  
3241 TAAATGGTTTGAAAAAATTAGCTGAGAGTCTAATTTTTTCATTTCAATATTCAAGTTAAT  
3301 GATATGCTATGAATATAAATAGCTAGTCGCTAAAATTCTAAAATAAAAAATGTTGTGAAC  
3361 GAAATGAAAATTGAATAAATTAC**GTA****AAAACACAATAAAAGCAATGATAACGAATTCCAAT**  
3421 **CTTTGTGTTTTTCAT**CGTTTAATTTGATCGATCGAGTCCAGGCTAAATATAAAAGCAATAT  
3481 TTATAGATAAAATCATTAAATTATTAACAATGATTAAGGACAAATTATTAATTACTCAA  
3541 ATTCGGATTTGCATAACATTAAATTACTTTTCTATTTGCCATTTAATTCAGTATAATTTA  
3601 TGAAATCCTTGTGTTTTAAGTTTAATGAACTTTCTGTTTTACTTTCTATGGCAATAAAT  
3661 TAGATTTTACTTGACCCGCTTCCCATTTTCAAGCAAATCTCATTTGCACAACATTTGGA  
3721 AAGAAGAAAGATATGCGCCTATCCTTTTTCTTGTAAATGTATGGTAAAAACCGATGAAGCA  
3781 TTTGGTATTTAAATTCCACTTCGATTGAAATATGCCAGAATTGCTGTTGGGCCGAACATC  
3841 ATGCGAATGTACTGAAAAACTTGAAGCA**ATT****TATT**ATATAGAAATTATTTTGCACCTGTG  
3901 GAGTAATACAATTGAATTGAATGTAAGCATTGCCCTTTGAAATAGCACTACTCATCCGAAA  
3961 GCTTCAGGAAAGCAAGCATTGTTTAAGGTATCACACCAAGAAGCACTGCATTTTCATTTAA  
4021 ATTATTTTTCTTGCAAATTGGGAAATAAAAGTACAAAATATAAAAAATCTTGAAAAATACAA  
4081 AAAAATAGTTTGTTCATTAATTTGTAATGTTAGAATCAGAATTGTATAACGGAAAGTTTG  
4141 ATTATATCCAAATTGCTTCTATACAAAATTTTTTATTTTCTTTTCATTTTTCGAAAAAT  
4201 ACTGAAAAAAGTCAAAAATATTCTAACTGTGACGGGCATCAATCAACTCTAATTACTC  
4261 ACAGCAAATGCATTTTGTCTCAGAATGAAGTCACTGGATGGGAATTAACAAAAAATTCAC  
4321 AAATGTTACAAAAGTTTGCATATATCCATTTTCATGTACTAACTAAAGTATAATTAATAT  
4381 GAGAAGACGAATATTTCCAGGAAGAGTTCCTCTATTACAATTTATGTATCGTCGAATGTT  
4441 CCTAACAGTCGATCTTTTTTCGTAAAGTTTAGAAGAAAGAATAAAATTTGAATGACTTCA  
4501 ATAACATATTGTGCTTTCTCGAAAGACTTCTTAGTCATTAAAGGGCGTCATTTCGAAGAC  
4561 TGTGTTTTTTGATTTCAGCAGAATTTCTGCTTACAAAATAAAATAAGATTAAATGATTTTTT  
4621 TCATTTATTTTGTTCGGATTAATATTTTCGCAAAATATTTCTACGATGATTTCTTTTTTA  
4681 ATTTTGCACCTTGAAAGAATATTTTATGTACATATGTGCTTATGTAAATCATCAATATTAA  
4741 GCATTACTACGGATTTCGTCGATTCAACCTGATCTGGAATGTTGCGTGCAAGCTCGCAAA  
4801 TCCGTTAATTAATTTAAATCTCTTGTCAATTAATATGAAAATGAAATAAATATTGTTG  
4861 AAATTCGAATGAATGCTAATTATATCGGTCCTTTTCAATGCTTGTAGTTTTTCAAAAAA  
4921 TGCAAAATTTGTGAAATTATGTGAACAGATAACGACTGGATAAGTTAAATCTCACATT  
4981 GTTTTTAATCAACTATTTTCATTGTGGTTTCAATGCACTTCACTAACGGTGGTGTAAGA  
5041 **TAATGGG**TAAATTTTTCTCTTCTTTCTATTTTAAATTCGAAAATTGTTTGCTGTTTTGG  
5101 AAAAACTCTGTAAACATTTAATTCTGATTCTTGATTTAATCAAAATGTAATAAAATTTATCT  
5161 TACAAAAGAAAGAAAAAGGAATTGGAATGTTTTAG**GGAAGTTCTGTGTGGTACTGTTTAT**  
5221 **ATCAATAAATATACTTTGCATCTTTGAAAACACTTTCTTAAGTTTCCG**TAAAGTTATAC  
5281 TGTTATTGCACAGTTTTCTACAGTATGAAACCATGTAAGTCAAAATTATCTCGTTTTAAT  
5341 CACTTATCAAAAAGTACGCTAAGCCAAAAATTGAGCCTTGATAGCAATTATGGATTGTC  
5401 GGAGTAAGCAAAAAGTGATAAAATATATCGCATTAAACAGTTTTGTACAATATATTTCAG  
5461 **GCCAATGATTTGATGTCAATGATCGAAGATGCAAAAATGCAAAAATGGATGATTTAAAT**  
5521 **GAGATAATCAATTCGAAATACTATCAAAACACTTTTAAATTTGATGT**GACGTCATGATTA  
5581 CTTCTAATCCGTTTCTTATCACTCCATAATTCAAGAATGTCACGTCACGAACCTTTCTGT  
5641 CAGGTTGATGTTATCTGATGTGTAATGACGTCACGATCAATGCTCATACGATTCATGTAA  
5701 TCAAGGGTGTAGAATGAAGGCTGATTGTCTTTTAGATCATTTAGTGCAATTTAACGAAT  
5761 GGCTTTGTAAATCTATCAGAAATGCTTCACATGTTCTGAATACCGCCATATTATATGACA  
5821 CTCCCATTTTCGGGAATTCTGCCCCGATATTTTCAATGGCGTACAATAAAGATAAAGTAGCA  
5881 TTTATTTCTATCGTTGTTATAAGCAGGTAAGAAAAATAACCGTAATATCTGTCACAAATGCA  
5941 **GCAACCAAAAAAGAGGGCGTCGAAAAAGGCAAGTCGAAGAGTCAGCATATTTGGAAGCT**  
6001 **AAATCGAATATTACAAAACTTGATAATACCGTCGCAAGCATGATAACAATTTGCGCAATT**  
6061 **CATGAATTGAACGATATGAATGT**GTTTGTTCATTTTTTCCATCAGTCATTAATAGGCTTAT

6121 TAAATTGCATAATTAAATGATATTTTGAAATTTTTTGAAAAAAGGAATGCTTAAAAAAT  
6181 GATTTGAGTCTTCAAGTATCACTGAGACTAAAGCAATGCTGCTAAATCATCGGGATAATG  
6241 AACATGGCAGAAATTACGACCAAATATTGATTAACATGCAAGGAAGAGGAAAAGTTAATTT  
6301 CGAAAATTTCTTTTCGTGGTATATTTCAACAAATTTTTTCATTTCAATTTCTATTTCTTTT  
6361 ATAG**TTATATCGCAACAAAATTAAACTGCTTGAAATATGTTGCAGAACTATTCAAATGA**  
6421 **TTAACAAACAACTGATAATGGCAGCAT**GTTTGTCTTACTATTAATTCAATCATGATTTT  
6481 GAATATCAATTTTTATCAGTAATTAACCAGCCTATTTCAATTTAATTAATTAATCACATT  
6541 GCATGAAAAATATTGCATAAAAAATATTGTATAAAGTTGCATAAAAAATAAACAGAATTGAA  
6601 AAAAAGTAATTTCTGCGA**AATATGGATTTTTATGTTAATCATTATTGGATGTTAGTACC**  
6661 **TGTATTCAATTTGGATTGCAATTATTTTATGTTGGAAAAATCTTCGATCACATTGGCG**  
6721 **TAAAATTATCGTACCATTGGCAACTGCG**GTAAGACAATGATCAATACCTCAACGAGATGA  
6781 TATTACACTGAAATATAATAGAATGACCGTTTGAGGCACTCAATTATATATTTTTTGATAG  
6841 TTAAAGTAACATAAGCTATCGTGCGCACTTTTAGA**AAGCATTGTGAAGTGAGCGGTAATCT**  
6901 **ATTAAACGTGAAAAACGAAATTATGACAATGCCAGCATGGGACG**GTTTCGTTATTTCTTTT  
6961 TTTCAAAAAAACCATCCAATATTTTGAAAGGTCTTTTCTGTTGAAATTATTTCAATTTGT  
7021 GATTAATTAATTCATTCACTCGTTTTATTTAGGATTAATATTTTGCAAAAAATTTTTTG  
7081 TTAAGATCACTTCATTTTGAATTTGTTTCTAAAGACATTTGAGATAATATTTTGTGTGTA  
7141 TAGGTCTATCTATAAATCATCAGTACTAAGAATTACTGTAAGATATGTCTTTGATCGAGT  
7201 CTGTTCTGACAATTGCGCTATCCAGAACAGATAATTGAGGTTATAACTGAGATTTTGA  
7261 TAAGATGTGGAACGAAAAGATTGTTAAAAATGCTAATGGATTGATTAGCAAAATACTTGAT  
7321 TGAAAATTTCTGCATAGAGAAGTGAAAAAGCAGTTTTTTCTAGATTCTTGATAAAATTAGGC  
7381 TTCTGAGAAAAAGCTGATACTGACCAAAAAGTTGATCTATGATCACTGTTTGTGATTTT  
7441 GCTAGCTATAGTTTTGTTATAATTGAAATTGTTTTACTTTTTAATCATTCTCATTTAT  
7501 TTCTATCCTAATTTATGCACTATTGAAATTTTTGTTATTAAGAATTAAACAAAAGCATT  
7561 TTGGAATTTTTGTTAAAAAATCATTTTTCGTTCCTTTGTTATTTTTCTGCATTTACGTTT  
7621 TTAAGATAATATATTACAACCACTTTCAAGAATTTACGTTTTTTTTTCACAATTTTTCCG  
7681 CTTATCTTATATTTTTTGAAATTTTGAATAATTTTTTAATGATTCCCTATTTTAAATTT  
7741 ACATTGAGTTATAGCAACTTCTAATGATAAGAAATGTAAAAAAGTTGTACAGTTCTTAAG  
7801 AAATTGGAACACAGAGTGTTTCTCTAAATATTGATAATAGTCCGTTTTTACTGATACAAT  
7861 TTGGAGTCTTTTACGTCCCACGAAAATATTATCAAATATGTGAAATAAGCAAGACATTAT  
7921 GGCGACAAAATCAGCTCCTAAATTCTTGCGTCATTTTCAGATACTCTCATTTACTTCAATA  
7981 ACTCACATCAGCAGTTTGTTTAATTGAGTCATTTTCGAAATATGCTTGGGCAGAGATGAAT  
8041 TGTCTCTCTTTAGTATACTTTGAAATGAATGATGAAGTAAATATTTTCAATATCATATT  
8101 CAATGTTATTTATATTTAAATAAAATGTTTGTAAGAAATATGGCATGTTTATGATAATA  
8161 AAAAATAATTACACCATTGATTTAGGCGTTCTGGAAGCTCGATTGCAACAGACAACCCAA  
8221 TCAGAGCGTGACGAAATTAAATGGTCGCCAGAGGAGGAAGCGGTTGAAATACAAAATCAG  
8281 CAAGAAAATAAGAAAATCACGCAAAAGTGAAAGGATAATATATATACAATTTAAATTTT  
8341 TAACAACTTATCAATTTGAGTCCAACGAAAACCTTTCTAATATATATAAATTTTTTCAAAA  
8401 GTTTTTTCGGAATACTGAACGTCAATAAAATGGATAAAATGAAAATTTGACGAATATTTGA  
8461 AATGAATATGGATCAGTCTTTTACATGCGTAAAAAATAAAAGTAAATGTATAAATTAATA  
8521 ATAAAAGTAAAGTGTATAAATAAAAGTAATGTATCATATGAAAGATTTGAAAGACATTTT  
8581 GTCACAAGTACCCTTCTTTGTATTACAAGATATCAAAATTAAGTTTCAGCTTTTTCT  
8641 ATCGTTGGTTAATCACTATGACTTCCTCCTCACCATAATTAATTTGAATAAATTAATAA  
8701 AAGATACGACAGATATGTTAGAAATGTGATGATGACTTCCTGACTGATTCTGTAAACCA  
8761 ATATATTTGTTGGCTATTAATTGTCTCATTAATTGAAATATAGGATTCTAATCTTATAT  
8821 TAAAAAAGTAAGAGTCTAAAATTTTGTAGCCGAGAAACTATATTTCCAAGATATTCAGCA  
8881 AAAAATAATTATGCAAAAATTGAAACCGAATTCTGGAATATAAGTAAATGTGTAATAATT  
8941 GATACCAAAGGATGAATTTGCAGCCTGTTCTAATGAAATTAGTACAGTTTGATTTACCT  
9001 TTTACATTTGATATTACGAGTACATAATTTCTTTGTACACTTTGCAAAATTAATATGTAT  
9061 GTTTTGAATTAATAATGATTTTAAATGAGCATTATTATCAAACCTCCAATTCTGATTCTA  
9121 ACATTACAAATTAATGGAACAACCTATTTTTTTGTATTTCCAAGATTTTATATTTTGTA  
9181 CTGTTTCTCAGTTTACAAGAAAAATGGTAAATTTAAATGAAAATGTGAGGTCTTTAGTGT  
9241 GATACCTTAAACAATGCCTGCTTTTCTGAAATTTTCGGATGAGTAGTGCTATTTCAAAGGC  
9301 AATGCTTACAGTTCAATTCAATTGCATTATTCCAAAATACAAAGTGAAACAATTTCTA**TA**  
9361 **TAAAT**GTCTCCCAATTTTTTCAATTCGGTCCAACAGAAATTTTGGCATATTTCAATCGAAG  
9421 TGAAATTGCATGTTATTGTTTGCATATTTCTATTGTATTTTGTCTATACTGCTTTATTTGA  
9481 TCTCCACAGTTGCAATCAGAAAGGATGGAATCACCTTGTTTCAAGATTATTACATTCACCT  
9541 CATGTGATAAGAGTACACCAGATATTTAGCTTTTTATATCAGTTGTTACTCTTACAATTT  
9601 TTATGTTAAATGGTACCAAAATTGTGTCATGTGTCATGCAAAAGCTTTTCACTTTCATTTG  
9661 GTCCAGCAAAATACTTAAGTTTAAACAGATTTTCGAGAAAAAAGTTTCGAGATTTAGTTACTGA  
9721 AATGTTTTTGGGCATCTTCGACGATTTATCTGATTGATTTGAATTGATTTCACCACTTTT  
9781 CACCGTTTTATCTCATTTTTTAATATTCTTTTTTAGCAATTCGATTCCAGGAAGTTATTAC  
9841 GTAAAAAGCGAAACCGAATAATGCCAATATGACAACATATGTAATGGTTGACCAAAACAA

```

9901 TTCCGGAGCTGTAAGATTGGCTACATATGTTAGTCACACGATTATTGTTCATTGAATGTTA
9961 ACTTTTCACATTTATTATAATTGTGTTATTACATTTTCATTTCACATAGTAATCAGTTTACAG
10021 ATGCTAATTTATATATAACAGAGGAAGTATTACCCTTTTCATTATCTCGTTGAAAGACGG
10081 TAAATTTCGATAGAGAAATACAAATATGGTCAGTACAGCCATTATTATCTATAAAATCAAAAG
10141 TCAGTATATGAAGTATTTATTTTGATCTTCGTAAGTAGTTTTTAATATTGAATTAGAGTA
10201 AAATTTAAAAGTAATACAAATGGAATTGAAATCCGAATTCCTTTTTTCAGATCATTTGAAC
10261 AATTTATGTTTTGTCAAGATTTATTTCAAAGAAGAAAAATTGCCATTTTATCATCAAC
10321 TAACAATCATCCAAATTAGCGATATAATAAATAACTTTTCGCTCAGTTGTAAGTGCGAATA
10381 CATTACGATTGAAACGATAAGAAGTACAATAATAAGCAAAAAATTTGGGATTGAATCTA
10441 ACGTGAATCCATAATCAATGAGGCTACGTGTACAAAGTACCATCGTTGCAACTAAGAATA
10501 GTACCAAGTAATATATATATCCATATCTTAATTTATACTTCATTTTCATTTCAATTTTAC
10561 ATTTGTTTTAGTTAATTTAATGGAATAATTGTGGTGGCTCTATTATGGTATTCCATACA
10621 CAGCAATACTATTTACACAAACCATATTATTTTAGCTTTAATTTTACGAAAAATACAAAT
10681 TTTCCAAATGCTCACTGTGATCGGTAGAGAAAGCAATTTGTCGCTTTTCTTATCCGTCTT
10741 TATATCATCAAAGTTATGATCTTCTAGCATTTTTCTATCAACGAATTTTCCTTCTAAGAT
10801 TCGTTATAAGCCAGCTTTTGTGCTTTAAAATGTTGGGCAAAAAATTTCCGTCAATACAAT
10861 GACCATCGATATTACAATGATCACTCTTAAACAATAATACAAACTACCAGTTCTCAATAG
10921 CTCTTAAGGCAATGAAAATAATTAATTGCCAACAATATTTATACGTTTCTCATTGTTTCAT
10981 TTATTTTGAATAAATTATATTTCCGTTGAAATTTATAATAAATTATTTAGGCATAAATAT
11041 TAAATGCAAATTTTCAGCATATATAAATAATGGGGAGAGAGTGTCACTTTTCATCATTTATT
11101 TCATTTTCTTATATTAACAATTGGTCAATTAGTATGGCATTTTCTTTTATTAGTAAATGC
11161 TTTCTTTCTTGACCAATAGCGATTCTTGTTTATCTATCGATGAAAAATTTTCAACCTTAC
11221 TAATTTATTTATATGTTCTTGATATTTTGCAGGTAACTGTGGATCGTAATTGCTGTG
11281 GTTTACTTGTTAAATACAATGAGCCAGGCTGATGGACAATCTCCTTTTAAGAAACC

```

### 8.3 Die Nukleotidsequenz der von den Genen *OvC29F5.1* und *Ov-Intergen* flankierenden, genomischen Region von *Onchocerca volvulus*

Die Abbildung 8-4 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte, genomische Sequenz von *O. volvulus*, die von den Genen *OvC29F5.1* und *Ov-Intergen* flankiert wird. Durch einen kursiven Fettdruck sind, wie folgt, die sechs Exons des *OvC29F5.1*-Gens und die ersten vier Exons des *Ov-Intergens* hervorgehoben; die Restriktionskarte und die genomische Organisation sind massstabsgerecht in Abb. 4-20 dargestellt.

**Abbildung 8-4: Die genomische *OvC29F5.1*-Intergen-Sequenz von *O. volvulus*.**

```

1  CTTGTGACATATAATCGTTCAAGGATTAAGACAAGCAAGCCTTCGGCCTTTAGGTAATGT
61  CAGCTGAAGGGTTTTGGTTATTTGATGGCTTGGAAAGAGGAACCATATGGCCTTTTACCGC
121 TTGTGAATTTATCTGGAAGGTTGGACCAACATCCACGAAATTTGTGGAAGAATTGGCT
181 CATATCAATGGTATTTGAATGACGAAACACCCACCATCATTGTAGTTTTTAGCATTTCTT
241 ACAATAAACAACTTGGTTTGAAAGTAATCAAGTTTGTTGTTACTCAATTCGAAATTAGCT
301 AATTTTTAATTTGCCGCATGGCGTGATATTTTAAACAACCTTTCAGTTTTTCTCCAT
361 CTTTTTCTTGAAAGCAAATGACAACCTTTTATATATTATGATTTAATAAATTACAAATATA
421 TATTGTAAGAAAAAGACTTATTTATCAAATTTCTTTGAATGTAAAAATCCATTAAACTG
481 CAATTAATTTCATAGAAGTTCTGATTTTACAATGAATAATGCCATCTTCAATATCCGAT
541 TAGACTGCTGGTGATTGAGTCATGATTAACGACTAAAACCTTAAAGCTCATTTTTATTTAG
601 ATGCCTGGAATGCCTTTGGAATCTTTCTACTGGGCAGGTGGCAAAATTACAACAAGATCAC
661 GGTGTGATTATATACGATGTTAATCACTTAAAAGTTTGCTTTTTATCCATTCAAAGAGCA
721 TAAGAGATTTAAATAGAACTAAGTTTAAATTTTGATTTTTTAAATACATATAAGAACC
781 TTTAGATTTGCAAAAATCAGTTAGCAGGAGCTTTACTCTTGTTATTTATGAGGCATCATG
841 AAGTTAATTGTCTTTCATCTTTACAAATCAGGGATTTTCTTAGCCACTGTTCAAAAACA
901 TAATTTTTGGCTTGAAACCAACTTTGTCGTTATTGATAGCAGATTTGCTCGATTGATAGA

```

961 AAGCTGCTAATCTGACAATTAGATTACAAATCAAGTTGAAATTGGCACTCCACCTGAAAA  
1021 TGCCAATAGTGCATATCCTATAGTTGTTTCATTAATGGAAGCATTAAAGTTTTAAATCA  
1081 ACTTATATCAATGTCTTGCAGATTCCAACCTGGTCCCTTAGATACAGCCATATTAGCTGCA  
1141 **CATTATACAACAACAAAAGCGAAGAAACCAATTAATTTCAATGACTACAACCTTTATCACT**  
1201 **GATGCTGTAAACTTGCAAAAATTGTTTCGCATTTGCGCAGGAAGCTGGTGATGGATTGTTT**  
1261 **CGAATTGATGCAGAACGAGTGGGGAAAACCGTTTTATTAAACGAG**GTAATTCGCATAGAGA  
1321 GAGTCACGTCTAAAACCGCAAAACGGATTTGAATTAAATTTTTATTACTTCAATTTTTT  
1381 ATGATTCCACTAATTAATGACACTGCTCAGTTTGATTGGATTTCATCAAAAGCATTTTTA  
1441 TAAACTAATAGCTCTACATTAATAAATTTCACTTTCTAATTTTCTGAGCGCATTTTCA  
1501 ACTACGATCAGTATATCATAAAGTAATATGATGGCATTGTTTATAAGCCTGTTTGTCTAT  
1561 ACTTTTTCTACAGCAATAATTCGTGAAAAAAATTCATCTATTGGTTAAAAAAAG  
1621 GAAAGAAAAAACTAGAAATAGAATTTGTCCTCCTTCTCCAGAAATCTTCTGTTTTCA  
1681 AAAAATTTTTCAAATTTAAAGTTTTGTGCACTTTATATTAGAGCTAGCTATAACGACAGT  
1741 ATTTTTTAG**GATGGAAGCATCAGATCTCATGGAAATTGGTCATGTAACATTTGATCAAGC**  
1801 **ACTAAAACGAAAAATGACGAAAGCGAGGTCAAAGTTCACTACTGGTCCATTTTTCCAGCT**  
1861 **CATTTCTTATCAATTTGGCCAATTCAACTACTGGTACGATTGGAAGTTGATTGCGCTGA**  
1921 **TTATGCTGCTGTGAAAATGCAAAG**GTAAGAATTTTACAGTTTGTGCTGATTATCTCAGTA  
1981 TTGTAATTATTTTTATTTATGAAAAATGAAATTTTCATCTGAGAATAGAAACAGCAAATTA  
2041 AATCTTCAAGGATAGATTGCAAGAGATTGCACCTAAGAAAGAACTTCAAATTTGAAATT  
2101 TCACCTTTTTAAAACTTTAGACCTGGTTCTTTCATACGTCGTCCTGTTAATTTCAATGAT  
2161 CTAATAATCTCCCAGAAATCTTTTCAATTTCTTTATCGATTTAAAAATTATGATGGTATGAA  
2221 AATTAAAAATAAGAAGATTTTTTTCATCTCGTTTTAGCATAAGGATTATTTCAAGATATCTT  
2281 GAAAATTTTTCAAAAACAGTGATTTTAAGAGCTGTAAGCTAAGTAAATATTTATTTGAGAA  
2341 CATATCTTACCACGAGATCTGAGATCTATTGTTTCGATGACTTAGGATATGAAATATCTT  
2401 ATAATCGAAATTTCTTCACTGTCTATCCTCCAATCTGGACAATTTGAAATTTATACATTTA  
2461 AAATTGCAAAATTTCTTAAATCAACCAATATACAAATAACAACAATGTTGATGAAGATAA  
2521 TAATGAATGAAATGAATGATTGAAAGATTGAAAAAAATTTGCGAAATATGTTTTATTTCCA  
2581 TTTGGTCGTTGAATCATTCATGTTGCAG**CGACAACCATTTGGAGAAAAGAGCGAGTCGG**  
2641 **AAACAAAAAAGAGAAGTTCAATGAAAATAATGTAATTTTATATATGGAATTCGGTGAAG**  
2701 **TTCCACGGAATATTCCGTTACAACCTGTTGACAACCTTATCCACAAGGTGCTGGATTTCAT**  
2761 **TCTTCACATGGGCACAAATGTTTTTCACTGCCGCAGATCAG**GTTTGTAATCAATTGCAA  
2821 GCGAAAGAGGTTGTGAGAATAATTAGTCCAACATCATGATTTTACACAAATTTGAATAAC  
2881 GCCTGAATAAGAAATATACTGCAATACTGAGCTAAAATATTTATAAAATAAACCTTCTGT  
2941 **AGGAGATTGTCGGCTGGTTCAAAGGAAATGGCGATTTTGGAAAACGAGCTGAACGCTC**  
3001 **TATCGGACATTTCTAAACTAATTAACCATTTGCCCTATGTGGTACTGTCAAAAGTTTCATG**  
3061 **ACTGCTTAGATAAAATTGCAAAATTTCTTGATAAAAAATGATCCTGAATTTAAATGTGCTT**  
3121 **TGATATGGAAAGGC AAAAATCATCTAGAAATTTTTGCTAAAACGAGTACCCTGGGGCTG**  
3181 **TTTCACCTGGAGTAAAAGAATTGATGAAGACACAATGCAAAAGAACTGGATGAATCAGAAAG**  
3241 **AATGAAAGAAGGATATGCAAGTGATAAAAAATTTAAAAATCCATTCATGAATTTTATATA**  
3301 TATTGAAATATGTTTAAATTTATACATTGGAAAAAGAAATTAATGAAATTTAAAAA  
3361 TATAACATCTGTTATAGCGTATTTCGAATTAACATAATGCATCGAAACCATAAACGAATG  
3421 TTTTGTCTTCGCATAATCCGAAGAAGATTTAAGGTTTTCAAACCTGATTAAAGTTTATAGA  
3481 TTCATCTCATCATCCTTCACTATTTTTATGATGTCAGGCGAGTTGCAGCATACTCGAAA  
3541 TTATTTCTGAAATGAATCAAGCATAAAGCAACTTTTTTTTCGTAACATAGAGATTGAGT  
3601 TTTTCGATTTCTACATTCCAATATCGAATGATTCAAAATGGATTTATGTTAAGAATTGTT  
3661 GACTTCTCAACATTTTGATTATATCGTATTGAGGAATATCATAGTTTATGTTACATAGAT  
3721 GCTTTTTTCATAACTATTTGAAATCCGTCAGAATTTAAACGACTTGACATCTACGAATTT  
3781 GAGGTTATATAAGAATTTATTAATTCATTTTACAATCCGAGAAATATCAAAATTTATAAAT  
3841 AGGAAAGATGATAAAGCATAACGTAAGTCATATCACAATCTTGACATAATTAAGCCAAA  
3901 GAAAATTAGAAACACATGTTCTTAATATCCGTTAGTGAAGGAAAGCAAAAAAAAAAAAAA  
3961 AAAAAAAAAAAAAAGATTTATACAGTACTATGGCAATCGAAATCTATGTACAATTATTTGT  
4021 AAGGTAATTTAAAAAAACTACGAGAACTCCTAAAATGTGTGCACTAAGTTTCCCATTTG  
4081 GAAATTGAAAAAGTCAGATGAATAAATCACGCAGATATCTCAAAATCACTTCGTTTTT  
4141 ACCGAAATATGTAATTATTGTTTTCTATACATGTGTAAATCCTTTACACTTGCAATAATC  
4201 TAAAATTATTTCAAGACAGTTGGCATCAATTTCTCGATCAATAATCAAAGCAATGCTTTC  
4261 TAATATTGCTTAGGAACGAGAAATGTAGTAAGAAAAATCTTTCTTATAGCATGAACCTA  
4321 TACTGTGCGGTACCAGCATAACTTACTCGAGCAGTTGCAGAAGCATTTTTGAGATGTAA  
4381 AATGTATTCACTGATATAAATAGTAAATTGCTTATAAACTCCGCAATCTTTTTTTTTAT  
4441 TTACTAATTTTACTTTCATTTGAACTCTTACTTTTATATTTGCCGTACTTTTATATTTACT  
4501 TTTATATTTGCCGTCCCCAGATTCATTTCTAGACTGATATCGTAAAAGTAACAAAGCTTT  
4561 CTTCAATCAAATATTTCTTTCCATCACATTTTGATAACATTATTATAATTTATAAACCAT  
4621 TTTCAATTCATAAATTAAGAATCTAAATTTTACTGAAAAATTTGCGGAATACTTTACATGTC  
4681 TATATAATTATAATAACACTGCTTAACCGTATGAAAAATTTAAAAATGAAATGATTTCTTG

4741 CAGTATAATAACTGTTACTTAATTCAGAACCGAAGTCAACTGGTTTGAAAATGAAACTGA  
4801 TTCAGTATTGAAATTCAAATGAGTGGATCACGATCATATCACTTTCTTGATGCTTGGTAA  
4861 TTTTTTCAAAAATACAAATTTTGTCAAAATCATATGTATAGATGATGATCAGGTGAGATA  
4921 AAATTATTGCATTGTTTTTAATCGACAGCTTTCATTGCGGTTGATTGCATTGATACTAAC  
4981 AGTAGTGCAATAAAAA**ATGGG**TGAGTTTTTCGTATGTTTCAGCTTTATTTCTGTAAAAAATG  
5041 CAAAATTTTTTGATATTTTAGAAAAATATATCAGAATACATGATGAGTCTGCATCTCAT  
5101 TCCGATTGCTGATTTAATCAAATAAGTAAATTAGTAAACAAAAAACGAAATGAAACGAT  
5161 ATGCGAAGTTTATAG**GCAAATTCTGTGTCATATTGTTTTATCAATGGATACATTTTGCA**  
5221 **TTTTCGAAAATACTTTACAGCTGCTTGG**GTAAGTTATACTAATTCTTTCTTATAACAAA  
5281 AAAAAAAAAAAAAATTGAGAAAAATTAAGATAGGGAAAAATTCTTTCTGATAACATGATCTT  
5341 ATACTGGGCAATATTTGCCTCCACGTTTCTCATTTCTAAACAGTATTAGACAGCCTCGTT  
5401 TTAACCGCTAATCGAGAAATTGATGCCAACTGTTCTGCAAGCGTTTTAGATTATTGTAGT  
5461 GATTGCAAAGAATGTAAATACATGGATCTTTTATCAGTATCAAGACTTCGATGCAATTT  
5521 **AGGTCAATAATATGATGTCAAAAATCGAGGATGGCAAATGCAAAAATTAGATGAACTAC**  
5581 **ATCAGATAATCAGTTCAAAATATTATCAAGAATTCTTAAACTCATTGT**GTAAATAGTATT  
5641 TATTTTCAACAAAATAATCCCATAGCGTCACAAATTTCTTCATCAGATCAAGAATCATCT  
5701 GATGTGTAGGCGAAGACGCGCTGCATCAATGATACTACGATTCATTTATGAAGCATTTT  
5761 GGTGGTGATTGCTGCTGATAAATGTTTAAAGATTAAGAAATATGTCCCATAGTGCTTTT  
5821 TACATTCATTGCCAGTTTCTCATCAAAGTAGTAAAAGAGATTCAGCTCAGGATTCCCAAT  
5881 GGCGCGCAGTAAAGATAAAGTAGCATTTACTTTTGTCAATTATATAAAATAATCAGTGATA  
5941 ACCCAAAAAATATAG**CTATCAAGAAAAAAGAACGTCAAAAGCGGCAAATCGAAGAACCAG**  
6001 **CATATTTGGGAGCTACTCGAATATTTACAAAACCTTGACAATACTGTTGCTAGCATGATAA**  
6061 **CAACTGTGGCAATTCATGAGTTGAATGATATGAATGT**

9.

**LITERATURVERZEICHNIS**

**ABRAHAM, D., WEINER, D.J., FARRELL, J.P. (1986).**

Protective immune responses of the jird to larval *Dipetalonema viteae*.  
Immunology **57**, 165-9.

**ABRAHAM, D., LUCIUS, R., TREES, A.J. (2002).**

Immunity to *Onchocerca* spp. in animal hosts.  
Trends Parasitol. **18**, 164-71.

**ADAM, R., FRIEDRICH, T., LUCIUS, R. (1994).**

Klonierung potentiell protektiver Antigene der Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae*.  
16. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie e.V., Bochum 21.-25.3.94, V2.

**ADAM, R., KALTMANN, B., RUDIN, W., FRIEDRICH, T., MARTI, T., LUCIUS, R. (1996).**

Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents.  
J. Biol. Chem. **27**, 1441-7.

**AIME, N., HAQUE, A., BONNEL, B., TORPIER, G., CAPRON, A. (1984).**

Neutrophil-mediated killing of *Dipetalonema viteae* microfilariae: simultaneous presens of IgE, IgG antibodies and complement is required.  
Immunology **51**, 585-94.

**ALI, M.M., BARAKA, O.Z., ABDELRAHMAN, S.I., SULAIMAN, S.M., WILLIAMS, J.F., HOMEIDA, M.M., MACKENZIE, C.D. (2003).**

Immune responses directed against microfilariae correlate with severity of clinical onchodermatitis and treatment history.  
J. Infect. Dis. **187**, 714-7.

**ANDERSON, R.C. (2000).**

Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission.  
CABI Publishing, 750.

**ALLEN, J.E. & MACDONALD, A.S. (1998).**

Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes.  
Parasite Immunol. **20**, 241-7.

**APFEL, H. & MEYER, T.F. (1990).**

Active release of surface proteins: a mechanism associated with the immune escape of *Acanthocheilonema viteae* microfilariae.  
Mol. Biochem. Parasitol. **43**, 199-210.

**ARAUJO, A.C., SOUTO-PADRON, T., DE SOUZA, W. (1994).**

Cytochemical analysis of the sheath of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*.  
Trop. Med. Parasitol. **45**, 347-51.

**AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1990ff).**

Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons.

**AWADZI, K., ADDY, E.T., OPOKU, N.O., PLENGE-BÖNIG, A., BÜTTNER, D.W. (1995).**

The chemotherapy of onchocerciasis XX: ivermectin in combination with albendazole.  
Trop. Med. Parasitol. **46**, 213-220.

**BAIN, O. (1967).**

Biologie larvaire et mécanisme de transmission de la filaire *Dipetalonema viteae*.  
Ann. Parasitol. Hum. Comp. **42**, 211-267.

**BANDI, C., ANDERSON, T.J., GENCHI, C., BLAXTER, M.L. (1998).**

Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes.  
Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **265**, 2407-2413.

**BANDI, C., TREES, A.J., BRATTIG, N.W. (2001).**

*Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases.  
Vet. Parasitol. **12**, 215-38.

**BARDEHLE, G., KLONISCH, T., SCHOTT, H. H., STIRM, S., ZAHNER, H. (1987).**

Isolation of pure sheaths of *Litomosoides carinii* microfilariae.  
Parasitol. Res. **74**, 188-90.

**BARDEHLE, G. (1990).**

Isolierung und biochemische Analyse der Mikrofilarienscheiden von *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea).  
Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**BARDEHLE, G., CONRATHS, F.J., FAHRENHOLZ, F., HINTZ, M., LINDER, D., SCHARES, G., SCHOTT, H.-H., SCHÜTZLE, B., STIRM, S., STÜBER, W., ZAHNER, H. (1991).**

A major *Litomosoides carinii* microfilarial sheath glycoprotein (gp22): amino terminal sequence and immunological studies with corresponding synthetic peptides.  
Parasitology **103**, 387-94.

**BARDEHLE, G., HINTZ, M., LINDER, D., SCHARES, G., SCHOTT, H.-H., STIRM, S., ZAHNER, H. (1992a).**

*Litomosoides carinii*: extraction of the microfilarial sheath components and antigenicity of the sheath fractions.  
Parasitol. Res. **78**, 501-8.

**BARDEHLE, G., JEPP-LIBUTZKI, A., LINDER, D., MOEHNLE, K., SCHOTT, H.-H., ZAHNER, H., ZÄHRINGER, U., STIRM, S. (1992b).**

Chemical composition of *Litomosoides carinii* microfilarial sheaths.  
Acta Trop. **50**, 237-47.

**BAYER, M. & WENK, P. (1988).**

Homologous and crossreacting immune response of the jird and cotton rat against microfilariae of *Dipetalonema viteae* and *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea).  
Trop. Med. Parasitol. **39**, 304-8.

**BEAVER, P.C., ORIHIEL, T.C., JOHNSON, M.H. (1974).**

*Dipetalonema viteae* in the experimentally infected jird, *Meriones unguiculatus*. II. Microfilaremia in relation to worm burden.  
J. Parasitol. **60**, 310-5.

**BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. (1979).**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1523.

**BLEISS, W., OBERLANDER, U., HARTMANN, S., ADAM, R., MARKO, A., SCHONEMEYER, A., LUCIUS, R. (2002).**

Protective immunity induced by irradiated third-stage larvae of the filaria *Acanthocheilonema viteae* is directed against challenge third-stage larvae before molting.  
J. Parasitol. **88**, 264-70.

**BOSSHARDT, S.C., MCVAY, C.S., COLEMAN, S.U., KLEI, T.R. (1992).**

*Brugia pahangi*: effects of maternal filariasis on the responses of their progeny to homologous challenge infection.  
Exp. Parasitol. **74**, 271-82.



**BRADFORD, M.M. (1976).**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal. Biochem. **72**, 248-254.

**BRATTIG, N.W., BUTTNER D.W., HOERAUF, A. (2001).**

Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria.  
Microbes Infect. **3**, 439-46.

**BÜTTNER, D.W., ALBIEZ, E.J., VON ESSEN, J., ERICHSEN, J. (1988).**

Histological examination of adult *Onchocerca volvulus* and comparison with the collagenase technique.  
Trop. Med. Parasitol. **39** Suppl. 4, 390-417.

**BÜTTNER, D.W., WANJI, S., BAZZOCCHI, C., BAIN, O., FISCHER, P. (2003).**

Obligatory symbiotic *Wolbachia* endobacteria are absent from *Loa loa*.  
Filaria J. **2**, 10.

**BYARS, N.E. & ALLISON, A.C. (1987).**

Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity.  
Vaccine **5**, 223-228.

**CASIRAGHI, M., ANDERSON, T.J., BANDI, C., BAZZOCCHI, C., GENCHI, C. (2001).**

A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts.  
Parasitology **122**, 93-103.

**CHANDRASHEKAR, R., RAO, U.R., RAJASEKARIAH, G.R., SUBRAMANYAM, D. (1984).**

Separation of viable microfilariae free of blood cells on Percoll gradients.  
Journal of Helminthology **58**, 69-70.

**CHANDRASHEKAR, R., RAO, U.R., SUBRAHMANYAM, D. (1990).**

Immune response to *Acanthocheilonema viteae* infection in multimammate rats (*Mastomys natalensis*).  
Immunol. Cell Biol. **68**, 21-6.

**CHIRGWIN, S.R., PORTHOUSE, K.H., NOWLING, J.M., KLEI, T.R. (2002).**

The filarial endosymbiont *Wolbachia* sp. is absent from *Setaria equina*.  
J. Parasitol. **88**, 1248-1250.

**CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987).**

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
Anal. Biochem. **162**, 156-159.

**CHRIST, H., HIRZMANN, J., CONRATHS, F., ZAHNER, H., STIRM, S., HOBOM, G. (1992).**

Trans-splicing of an early embryo mRNA in *Litomosoides carinii*, coding for the major microfilarial sheath protein gp22.  
Gene **121**, 219-26.

**COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M., STROBER, W. (1995).**

Current protocols in immunology. John Wiley & Sons.

**CONRATHS, F.J., SCHUTZLE, B., SCHARES, G., CHRIST, H., HOBOM, G., ZAHNER, H. (1993).**

The gene coding for the major sheath protein of *Litomosoides carinii* microfilariae, gp22, is transcribed in oocytes and embryonic cells.  
Mol. Biochem. Parasitol. **60**, 111-20.

**CONRATHS, F.J., HIRZMANN, J., HOBOM, G., ZAHNER, H. (1997).**

Expression of the microfilarial sheath protein 2 (shp2) of the filarial parasites *Litomosoides sigmodontis* and *Brugia malayi*.  
Exp. Parasitol. **85**, 241-8.

**CRAWFORD, C.R., PATEL, D.H., NAEVE, C., BELT, J.A. (1998).**

Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line.  
J. Biol. Chem. **273**, 5288-5293.

**DAFA'ALLA, T.H. (1997).**

Characterisation of two novel genes of *Litomosoides sigmodontis*.  
Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**DAFA'ALLA, T.H., TAUBERT, A., HOBOM, G., BECK, E., ZAHNER, H. (2000).**

Molecular characterisation of a *Litomosoides sigmodontis* protein involved in the development of the microfilarial sheath during embryogenesis.  
Mol. Biochem. Parasitol. **106**, 37-50.

**DARGE, K., LUCIUS, R., MONSON, M.H., BEHRENDSEN, J., BUTTNER, D.W. (1991).**

Immunohistological and electron microscopic studies of microfilariae in skin and lymph nodes from onchocerciasis patients after ivermectin treatment.  
Trop. Med. Parasitol. **42**, 361-7.

**DAS, P.K., RAMAIAH, K.D., AUGUSTIN, D.J., ASHOK KUMAR (2000).**

Towards elimination of lymphatic filariasis in India.  
Trends in Parasitology **10**, 457-460.

**DE SOUZA, W., SOUTO-PADRON, T., DREYER, G., DE ANDRADE, L.D. (1989).**

Fine structure and localization of anionic sites on the surface of microfilaria of *Wuchereria bancrofti*.  
J. Submicrosc. Cytol. Pathol. **21**, 121-9.

**DEVANEY, E. (1985).**

Lectin-binding characteristics of *Brugia pahangi* microfilariae.  
Trop. Med. Parasitol. **36**, 25-8.

**DIESFELD, H.J., KIRSTEN, C., STAPPERT, U. (1981).**

Vergleichende Immunfluoreszenz-histologische Untersuchungen an 7 Nematodenspezies in bezug auf ihre Antigeneigenschaften zur Differenzierung von Nematodeninfektionen.  
Tropenmed. Parasit. **32**, 253-258.

**DI NOIA, J.M., SANCHEZ, D.O., FRASCH, A.C. (1995).**

The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family of genes resembling the mucins genes of mammalian cells.  
J. Biol. Chem. **270**, 24146-24149.

**DOETZE, A., SATOGUINA, J., BURCHARD, G., RAU, T., LOLIGER, C., FLEISCHER, B., HOERAUF, A. (2000).**

Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift.  
Int. Immunol. **12**, 623-30.

**EBERHARD, M.L., ORIHEL, T.C. (1986).**

*Loa loa*: output of microfilariae in single pair infections.  
Trop. Med. Parasitol. **37**, 369-74.

**ELSON, L.H., CALVOPINA, M., PAREDES, W., ARAUJO, E., BRADLEY, J.E., GUDERIAN, R.H., NUTMAN, T.B. (1995).**

Immunity in onchocerciasis: Putative immune persons produce a Th1-like response to *Onchocerca volvulus*.  
Immunol. Today **171**, 652-8.

**ELSON, L.H., DAYS, A., CALVOPINA, M., PAREDE, S W., ARAUJO, E., GUDERIAN, R.H., BRADLEY, J.E., NUTMAN, T.B. (1996).**

*In utero* exposure to *Onchocerca volvulus*: relationship to subsequent infection intensity and cellular immune responsiveness.  
Infect. Immun. **64**, 5061-5.

**FRANZ, M. & ANDREWS, P. (1986).**

Histology of adult *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea).  
Z. Parasitenkd. **72**, 387-395.

**FRANZ, M. & BÜTTNER, D.W. (1986).**

Histology of adult *Brugia malayi*.  
Trop. Med. Parasit. **37**, 282-285.

**GALLIN, M., EDMONDS, K., ELLNER, J.J., ERTTMANN, K.D., WHITE, A.T., NEWLAND, H.S., TAYLOR, H.R., GREENE, B.M. (1988).**

Cell-mediated immune responses in human infection with *Onchocerca volvulus*.  
J. Immunol. **140**, 1999-2007.

**GATRILL, A.J., KEE, J., BEHNKE, J.M., WAKELIN, D. (1991).**

*Acanthocheilonema viteae* (*Dipetalonema viteae*) in mice: differences in the relative binding of microfilarial surface-specific antibody may explain the contrasting response phenotypes of BALB/c and C57BL/10.  
J. Helminthol. **65**, 211-8.

**GREENE, G.M., FANNING, M.M., ELLNER, J.J. (1983).**

Non-specific suppression of antigen-induced lymphocyte blastogenesis in *Onchocerca volvulus* infection in man.  
Clin. Exp. Immunol. **96**, 259-65.

**GREENE, B.M., GBAKIMA, A.A., ALBIEZ, E.J., TAYLOR, H.R. (1985a).**

Humoral and cellular immune responses to *Onchocerca volvulus* infection in humans.  
Rev. Infect. Dis. **7**, 789-95.

**GREENE, B.M., TAYLOR, H.R., CUPP, E.W., MURPHY, R.P., WHITE, A.T., AZIZ, M.A., SCHULZ-KEY, H., D'ANNA, S.A., NEWLAND, H.S., GOLDSCHMIDT, L.P., ET, A.L. (1985b).**

Comparison of ivermectin and diethylcarbamazine in the treatment of onchocerciasis.  
N. Engl. J. Med. **313**, 133-138.

**GREENE, B.M. (1990).**

Onchocerciasis.

In: Tropical and Geographical Medicine 2<sup>nd</sup> Ed., ed. K.S. Warren and A.A.F. Mahmood, McGraw Inc. New York, 429-439.

**GROBUSCH, M.P., KOMBILA, M., AUTENRIETH, I., MEHLHORN, H., KREMSNER, P.G. (2003).**

No evidence of *Wolbachia* endosymbiosis with *Loa loa* and *Mansonella perstans*.  
Parasitol. Res. **14**, [Epub ahead of print].

**HALL, L.R. & PEARLMAN, E. (2002).**

Pathogenesis of onchocercal keratitis.  
Clin. Microbiol. Rev. **12**, 445-453.

**HAMMERBERG, B., RIKIHISA, Y., KING, M.W. (1984).**

Immunoglobulin interactions with surfaces of sheathed and unsheathed microfilariae.  
Parasite Immunol. **6**, 421-34.

**HAMMOND, M.P. (1994).**

Codon usage and gene organization in *Brugia*.  
Parasitol. Res. **80**, 173-175.

**HAQUE, A., JOSEPH, M., OUAISSI, M.A., CAPRON, M., CAPRON, A. (1980).**

IgE antibody-mediated cytotoxicity of rat macrophages against microfilaria of *Dipetalonema viteae* in vitro.  
Clin. Exp. Immunol. **40**, 487-95.

**HAQUE, A., OUAISSI, A., JOSEPH, M., CAPRON, M., CAPRON, A. (1981).**

IgE antibody in eosinophil- and macrophage-mediated in vitro killing of *Dipetalonema viteae* microfilariae.  
J. Immunol. **127**, 716-25.

**HAQUE, A. & CAPRON, A. (1982).**

Transplacental transfer of rodent microfilariae induces antigen-specific tolerance in rats.  
Nature **299**, 361-3.

**HAQUE, A., CUNA, W., PESTEL, J., CAPRON, A., BONNEL, B. (1988).**

Tolerance in rats by transplacental transfer of *Dipetalonema viteae* microfilariae: recognition of putative tolerogen(s) by antibodies that inhibit antigen-specific lymphocyte proliferation.  
Eur. J. Immunol. **18**, 1167-72.

**HARNETT, W., MEGHJI, M., WORMS, M.J., PARKHOUSE, R.M. (1986).**

Quantitative and qualitative changes in production of excretions/secretions by *Litomosoides carinii* during development in the jird (*Meriones unguiculatus*).  
Parasitology **93**, 317-31.

**HARNETT, W., WORMS, M.J., KAPIL, A., GRAINGER, M., PARKHOUSE, R.M. (1989).**

Origin, kinetics of circulation and fate in vivo of the major excretory-secretory product of *Acanthocheilonema viteae*.  
Parasitology **99**, 229-39.

**HARNETT, W., WORMS, M.J., GRAINGER, M., PYKE, S.D., PARKHOUSE, R.M. (1990).**

Association between circulating antigen and parasite load in a model filarial system, *Acanthocheilonema viteae* in jirds.  
Parasitology **101**, 435-44.

**HARNETT, W., HOUSTON, K.M., AMESS, R., WORMS, M.J. (1993).**

*Acanthocheilonema viteae*: phosphorylcholine is attached to the major excretory-secretory product via an N-linked glycan.  
Exp. Parasitol. **77**, 498-502.

**HARNETT, W., DEEHAN, M.R., HOUSTON, K.M., HARNETT, M.M. (1999a).**

Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein.  
Parasite Immunol. **21**, 601-8.

**HARNETT, W., HOUSTON, K.M., TATE, R., GARATE, T., APFEL, H., ADAM, R., HASLAM, S.M., PANICO, M., PAXTON, T., DELL, A., MORRIS, H., BRZESKI, H. (1999b).**

Molecular cloning and demonstration of an aminopeptidase activity in a filarial nematode glycoprotein.  
Mol. Biochem. Parasitol. **104**, 11-23.

**HARNETT, M.M. & HARNETT, W. (2001).**

Antigen receptor signaling is subverted by an immunomodulatory product secreted by a filarial nematode.  
Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). **49**, 263-9.

**HARNETT, W., HARNETT, M.M., BYRON, O. (2003).**

Structural/Functional Aspects of ES-62 - A Secreted Immunomodulatory Phosphorylcholine-Containing Filarial Nematode Glycoprotein.  
Curr. Protein. Pept. Sci. **4**, 59-71.

**HARTMANN, N., STUCKAS, H., LUCIUS, R., BLEISS, W., THEURING, F., KALINNA, B.H. (2003)**

Trans-species transfer of *Wolbachia*: microinjection of *Wolbachia* from *Litomosoides sigmodontis* into *Acanthocheilonema viteae*.  
Parasitology **126**, 503-11.

**HASLAM, S.M., HOUSTON K.M., HARNETT, W., REASON, A.J., MORRIS, H.R., DELL, A. (1999).**

Conservation of phosphorylcholine-substituted glycans among species and discovery of novel chito-oligomers.  
J. Biol. Chem. **274**, 20953-20960.

**HILKENS, J., LIGTENBERG, M.J.L., VOS, H.L., LITVINOV, S.V., (1992).**

Cell membrane-associated mucins and their adhesions-modulating property.  
Trends Biochem. Sci. **17**, 359-363.

**HINTZ, M., HIRZMANN, J., HOBOM, G., LINDER, D., LOTTSPEICH, F., SCHOTT, H.H., CONRATHS, F.J., ZAHNER, H., STIRM, S. (1994).**

*Litomosoides carinii* microfilarial sheaths: partial amino acid sequences of several major polypeptide constituents.

Mol. Biochem. Parasitol. **67**, 69-78.

**HINTZ, M. (1995)**

Die Proteine der Mikrofilarienscheide von *Litomosoides carinii*.

Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**HINTZ, M., KASPER, M., STAHL, B., GEYER, R., KALINOWSKI, H.-O., KARAS, M., KÜHNHARDT, S., SCHOTT, H.-H., CONRATHS, F., ZAHNER, H., STIRM, S. (1996).**

Dimethylaminoethanol is a major component of the *Litomosoides carinii* microfilarial sheath.

Mol. Biochem. Parasitol. **76**, 325-328.

**HINTZ, M., SCHARES, G., TAUBERT, A., GEYER, R., ZAHNER, H., STIRM, S., CONRATHS, F.J. (1998).**

Juvenile female *Litomosoides sigmodontis* produce an excretory/secretory antigen (Juv-p120) highly modified with dimethylaminoethanol.

Parasitology **117**, 265-71.

**HIRZMANN, J., SCHNAUFER, A., HINTZ, M., CONRATHS, F., STIRM, S., ZAHNER, H., HOBOM, G. (1995).**

*Brugia* spp. and *Litomosoides carinii*: identification of a covalently cross-linked microfilarial sheath matrix protein (shp2).

Mol. Biochem. Parasitol. **70**, 95-106.

**HIRZMANN, J. (1997).**

Molekularbiologie der Mikrofilarienscheide: Isolierung, Charakterisierung und Vergleich von Strukturprotein-Genen der Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis* und der humanpathogenen Filarie *Brugia malayi*.

Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**HIRZMANN, J. & ZAHNER, H. (2000).**

Microfilarial sheath protein homologues in the rodent filaria *Acanthocheilonema viteae*.

Abstracts 19. Tagung Deutsch. Ges. Parasit., Stuttgart-Hohenheim, 27-8.

**HIRZMANN, J., PANTCHEV, N., DAFA'ALLA, T., GEYER, R., HINTZ, M., HOBOM, G., KASPER, M., TAUBERT, A., ZAHNER, H. (2001).**

Molecular biology of eggshell and microfilarial sheath proteins.

Abstracts Conference on Filariasis, Hamburg, 15.

**HIRZMANN, J., HINTZ, M., KASPER, M., SHRESTA, T.R., TAUBERT, A., CONRATHS, F.J., GEYER, R., STIRM, S., ZAHNER, H., HOBOM, G. (2002).**

Cloning and expression analysis of two mucin-like genes encoding microfilarial sheath surface proteins of the parasitic nematodes *Brugia* and *Litomosoides*.

J. Biol. Chem. **277**, 47603-47612.

**HIRZMANN, J., HINTZ, M., STIRM, S., ZAHNER, H., HOBOM, G. (in Vorbereitung).**

Molecular characterisation of Shp4, a protein of the *Litomosoides sigmodontis* microfilarial sheath.

**HOERAUF, A., BÜTTNER, D.W., ADJEI, O., PEARLMAN, E. (2003).**

Onchocerciasis.

BMJ **326**, 207-210.

**HOFFMANN, W.H., PFAFF, A.W., SCHULZ-KEY, H., SOBOSLAY, P.T., SOBOSLAV, P.T. (2001).**

Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in *Litomosoides sigmodontis* filariasis.

Parasitology **122**, 641-9.

**HOPP, T.P. & WOODS, K.P. (1981).**

Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **78**, 3824-3828.

**JIN, J., POOLE, C.B., SLATKO, B.E., MCREYNOLDS, L.A. (1999).**

Alternative splicing creates sex-specific transcripts and truncated forms of the furin protease in the parasite *Dirofilaria immitis*.  
Gene **237**, 161-75.

**JOHNSON, M.H., ORIHIEL, T.C., BEAVER, P.C. (1974).**

*Dipetalonema viteae* in the experimentally infected jird, *Meriones unguiculatus*. I. Insemination, development from egg to microfilaria, reinsemination, and longevity of mated and unmated worms.  
J. Parasitol. **60**, 302-309.

**JUNG, S (1962).**

Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere.  
Fischer, Stuttgart.

**KASPER, M. (2000).**

Analyse der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in den Mikrofilarienscheiden von *Litomosoides sigmodontis*.  
Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**KEISER, P.B., REYNOLDS, S.M., AWADZI, K., OTTESEN, E.A., TAYLOR, M.J., NUTMAN, T.B. (2002).**

Bacterial endosymbionts of *Onchocerca volvulus* in the pathogenesis of posttreatment reactions.  
J. Infect. Dis. **185**, 805-11.

**KING, C.L. & NUTMAN, T.B. (1992).**

Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis.  
Immunol. Today **12**, A54-8.

**KLEI, T.R., BLANCHARD, D.P., COLEMAN, S.U. (1986).**

Development of *Brugia pahangi* infections and lymphatic lesions in male offspring of female jirds with homologous infections.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **80**, 214-6.

**KLONISCH, T., BARDEHLE, G., LINDER, D., BOSCHEK, B., SCHOTT, H.H., ZAHNER, H., STIRM, S. (1991).**

The sheaths of *Brugia microfilariae*: isolation and composition.  
Parasitol. Res. **77**, 448-51.

**KRUPPA, T.F., IGLAUER, F., IHNEN, E., MILLER, K., KUNSTYR, I. (1990).**

*Mastomys natalensis* or *Mastomys coucha*. Correct species designation in animal experiments.  
Trop. Med. Parasitol. **41**, 219-20.

**LAEMMLI, U.K. (1970).**

Cleavage of structural proteins during the assembly on the head of bacteriophage T4.  
Nature **227**, 680-685.

**LÄMMLER, G., SAUPE, G., HERZOG, H. (1968).**

Infektionsversuche mit der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides carinii* bei *Mastomys natalensis* (Smith 1834).  
Z. Parasitenkd. **30**, 281-90.

**LANGWORTHY, N.G., RENZ, A., MACKENSTEDT, U., HENKLE-DUHRSEN, K., DE BRONSVOORT, M.B., TANYA, V.N., DONNELLY, M.J., TREES, A.J. (2000).**

Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship.  
Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **267**, 1063-9.

**LARSEN, N.I., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. (1995).**

Analysis of eukaryotic promoter sequences reveals a systematically occurring CT-Signal.  
Nucleic Acids Res. **23**, 1225-30.

**LOK, J.B. & ABRAHAM, D. (1992).**

Animal models for the study of immunity in human filariasis.  
Parasitology Today **8**, 168-71.

**LONDONO, I. (1976a).**

Distribution and movement of infective-stage larvae of *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) in the vector tick, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae).  
J. Parasitol. **62**, 589-95.

**LONDONO, I. (1976b).**

Behavior of *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) during escape from the vector tick, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae).  
J. Parasitol. **62**, 596-603.

**LUCIUS, R., RUPPEL, A., DIESFELD, H.J. (1986).**

*Dipetalonema viteae*: resistance in *Meriones unguiculatus* with multiple infections of stage-3 larvae.  
Exp. Parasitol. **62**, 237-46.

**LUCIUS, R., KAPAUN, A., DIESFELD, H.J. (1987).**

*Dipetalonema viteae* infection in three species of rodents: species specific patterns of the antibody response.  
Parasite Immunol. **9**, 67-80.

**LUCIUS, R., TEXTOR, G., KERN, A., KIRSTEN, C. (1991).**

*Acanthocheilonema viteae*: vaccination of jirds with irradiation-attenuated stage-3 larvae and with exported larval antigens.  
Exp. Parasitol. **73**, 184-96.

**LUCIUS, R. & TEXTOR, G. (1995).**

*Acanthocheilonema viteae*: Rational design of the life cycle to increase production of parasite material using less experimental animals.  
Appl. Parasitol. **36**, 22-33.

**MAIZELS, R.M., & LAWRENCE, R.A. (1991).**

Immunological tolerance: the key feature in human filariasis.  
Parasitology Today **7**, 271-276.

**MAIZELS, R.M., BUNDY D.A.P., SELKIRK M.E., SMITH D.F., ANDERSON, R.M. (1993).**

Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations.  
Nature **365**, 797-805.

**MAIZELS, R.M., GOMEZ-ESCOBAR, N., GREGORY, W.F., MURRAY, J., ZANG, X. (2001).**

Immune evasion genes from filarial nematodes.  
Int. J. Parasitol. **31**, 889-98.

**MANDRELL, R.E. & ZOLLINGER, W.D. (1984).**

Use of a Zwitterionic Detergent for the Restoration of the Antibody-Binding Capacity of Electroblotted Meningococcal Outer Membrane Proteins.  
Journal of Immunological Methods **67**, 1-11.

**MCGARRY, H.F., PFARR, K., EGERTON, G., HOERAUF, A., AKUE, J.P., ENYONG, P., WANJI, S., KLAGER, S.L., BIANCO, A.E., BEECHING, N.J., TAYLOR, M.J. (2003).**

Evidence against *Wolbachia symbiosis* in *Loa loa*.  
Filaria J. **2**, 9.

**MCLAREN, D.J., WORMS, M.J., LAURENCE, B.R., SIMPSON, M.G. (1975).**

Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda).  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **69**, 509-514.

**MCMAHON, J.E. & SIMONSEN, P.E. (1996).**

Filariasis.  
In: *Manson's Tropical Diseases* 20<sup>th</sup> Ed., ed. G.C. Cook, W.B. Saunders Company London, 1321-1369.

**MENRATH, M., MICHEL, A., KUNZ, W. (1995).**

A female-specific cDNA sequence of *Schistosoma mansoni* encoding a mucin-like protein that is expressed in the epithelial cells of the reproductive tract.

Parasitology **111**, 477-483.

**MEYER, C.G., GALLIN, M., ERTTMANN, K.D., BRATTIG, N., SCHNITTGER, L., GELHAUS, A. TANNICH, E., BEGOVICH, A.B., ERLICH, H.A., HORSTMANN, R.D. (1994).**

HLA-D alleles associated with generalized disease, localized disease, and putative immunity in *Onchocerca volvulus* infection.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **91**, 7515-9.

**MISRA, S., MUKHERJEE, M., DIKSHIT, M., CHATTERJEE, R.K. (1998).**

Cellular immune response of *Mastomys* and gerbils in experimental filariasis.

Trop. Med. Int. Health. **3**, 124-9.

**MÖSSINGER, J. & WENK, P. (1986).**

Fecundity of *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea) in vivo and in vitro.

Z. Parasitenkd. **72**, 121-131.

**MULLIS, K.B., FALOONA, F., SCHARF, S.J., SAIKI, R.K., HORN, G.T., ERLICH, H.A. (1986).**

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **51**, 263-273.

**MURDOCH, M.E. (1992).**

The skin and the immune response in onchocerciasis.

Trop. Doctor. **22** (Suppl.1), 44-55; 61-2.

**NILSEN, T.W. (1993).**

Trans-splicing of nematode premessenger RNA.

Annu. Rev. Microbiol. **47**, 413-440.

**NILSEN, T.W. (1995).**

Trans-splicing: An update.

Mol. Biochem. Parasitol. **73**, 1-6.

**OBERMEIER, N. (2002).**

Isolierung und Charakterisierung eines Spectrin-Gens von *Brugia malayi*.

Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**OKAJIMA, T., TANABE, T., YASUDA, T. (1993).**

Nonurea sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis with high-molarity buffers for the separation of proteins and peptides.

Anal. Biochem. **211**, 293-300.

**OTTESEN, E.A., WELLER, P.F., HECK, L. (1977).**

Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis.

Immunology **33**, 413-21.

**OTTESEN, E.A. (1980).**

Immunopathology of lymphatic filariasis.

Springer Seminars in Immunopathology **2**, 373-385.

**OTTESEN, E.A. (1984).**

Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **78** (Suppl.), 9-18.

**OTTESEN, E.A. (1989).**

Filariasis now.

Am. J. Trop. Med. Hyg. **41**(3 Suppl), 9-17.



**OTTESEN, E.A. (1990).**

The filariasis and tropical eosinophilia.

In: Tropical and Geographical Medicine 2<sup>nd</sup> Ed., ed. K.S. Warren and A.A.F. Mahmod, McGraw Inc. New York, 407-429.

**OTTESEN, E.A. (2000).**

The global programme to eliminate lymphatic filariasis.

Tropical Medicine and International Health **5**, 591-594.

**PANTCHEV, N., HIRZMANN, J., ZAHNER, H. (2002).**

Search for homologues of the microfilarial sheath surface proteins Shp 3a and Shp 3 in the unsheathed filariae *Acanthocheilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*.

Abstracts Joint Ann. Meeting German Dutch Soc. Parasitol., Lübeck-Travemünde, 92-3.

**PASTRANA, D.V., RAGHAVAN, N., FITZGERALD, P., EISINGER, S.W., METZ, C., BUCALA, R., SCHLEIMER, R.P., BICKEL, C., SCOTT, A.L. (1998).**

Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor.

Infect. Immun. **66**, 5955-63.

**PETERS, W., SCHRAERMEYER, U., ZAHNER, H. (1987).**

Formation and degradation of chitin during the development of microfilariae.

Trop. Med. Parasitol. **38**, 70.

**PETRALANDA, I., YARZABAL, L., PIESENS, W.F. (1988).**

Parasite antigens are present in breast milk of women infected with *Onchocerca volvulus*.

Am. J. Trop. Med. Hyg. **38**, 372-9.

**PIESENS, W.F., MCGREEVY, P.B., PIESENS, P.W., MCGREEVY, M., KOIMAN, I., SAROSO, J.S., DENNIS, D.T. (1980).**

Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: specific cellular unresponsiveness to filarial antigens.

J. Clin. Invest. **65**, 172-9.

**PIESENS, W.F., WADEE, A.A., KURNIAWAN, L. (1987).**

Regulation of immune responses in lymphatic filariasis.

Ciba Found. Symp. **127**, 164-79.

**PLAISIER, A.P., VAN OORTMARSEN, G.J., REMME, J., HABBEMA, J.D. (1991).**

The reproductive lifespan of *Onchocerca volvulus* in west African savanna.

Acta Trop. **48**, 271-284.

**PLAPPERT, S., RENZ, A., TREES, S., MACKENSTEDT, U. (2002)**

*Wolbachia* endobacteria in *Onchocerca ochengi*: Ultrastructure, occurrence and treatment.

Abstracts Joint Ann. Meeting German Dutch Soc. Parasitol., Lübeck-Travemünde, 37-8.

**PLENGE-BÖNIG, A., KROMER, M., BÜTTNER, D.W. (1995).**

Light and electron microscopy studies on *Onchocerca jakutensis* and *O. flexuosa* of red deer show different host-parasite interactions.

Parasitol. Res. **81**, 66-73.

**PLIER, D.A., AWADZI, K., FREEDMAN, D.O. (1996).**

Immunoregulation in onchocerciasis: persons with ocular inflammatory disease produce a Th2-like response to *Onchocerca volvulus* antigen.

J. Infect. Dis. **174**, 380-6.

**RAGHAVAN, N., FREEDMAN, D.O., FITZGERALD, P.C., UNNASCH, T.R., OTTESEN, E.A., NUTMAN, T.B. (1994).**

Cloning and characterization of a potentially protective chitinase-like recombinant antigen from *Wuchereria bancrofti*.

Infect. Immun. **62**, 1901-8.

**RAETHER, W. & MAYERHÖFER, W (1967).**

Quantitative Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Mikrofilarien (*Litomosoides carinii*) mit Hilfe der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal und Jessen sowie Anreicherungsverfahren.  
Z. Tropenmed. Parasitol. **18**, 99-108.

**RAVINDRAN, B., SATAPATHY, A.K., SAHOO, P.K., BABU GEDDAM, J.J. (2000).**

Protective immunity in human Bancroftian filariasis: inverse relationship between antibodies to microfilarial sheath and circulating filarial antigens.  
Parasite Immunol. **22**, 633-7.

**REITZENSTEIN, C. (2003).**

Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen des schützenden Proteins Bp1 aus der Mikrofilarienscheide der Filarie *Brugia pahangi*.  
Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**ROGERS, R., ELLIS, D.S., DENHAM, D.A. (1976).**

Studies with *Brugia pahangi*. 14. Intrauterine development of the microfilaria and a comparison with other filarial species.  
J. Helminthol. **50**, 251-7.

**SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., Erlich, H., ARNHEIM, N. (1985).**

Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
Science **230**, 1350-1354.

**SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HOM, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. (1988).**

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase.  
Science **239**, 487-491.

**SÄNGER, I. & LÄMMLER, G. (1979).**

On *Dipetalonema viteae* Infection of *Mastomys natalensis*.  
Tropenmed. Parasit. **30**, 81-87.

**SAMBROOK, J., FRITSCH E.F., MANIATIS, T. (1989).**

Molecular cloning: A laboratory manual 2nd ed.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**SCHAGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987).**

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa.  
Anal. Biochem. **166**, 368-379.

**SCHARES, G., SCHÜTZLE, B., ZAHNER, H., CONRATHS, F.J. (1994).**

Surface antigens of *Litomosoides carinii* microfilariae: agglutinating antibodies react with sheath components of 40 and 120 kiloDalton molecular mass.  
Parasitology **109**, 73-82.

**SCHIERACK, P., LUCIUS, R., SONNENBURG, B., SCHILLING, K., HARTMANN, S. (2003).**

Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin.  
Infect. Immun. **71**, 2422-9.

**SCHÖNEMEYER, A., LUCIUS, R., SONNENBURG, B., BRATTIG, N., SABAT, R., SCHILLING, K., BRADLEY, J., HARTMANN, S. (2001).**

Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*.  
J. Immunol. **167**, 3207-15.

**SCHRAERMEYER, U., PETERS, W., ZAHNER, H. (1987a).**

Lectin binding studies on adult filariae, intrauterine developing stages and microfilariae of *Brugia malayi* and *Litomosoides carinii*.  
Parasitol. Res. **73**, 550-6.

**SCHRAERMAYER, U., PETERS, W., ZAHNER, H. (1987b).**

Formation by the uterus of a peripheral layer of the sheath in microfilariae of *Litomosoides carinii* and *Brugia malayi*.

Parasitol. Res. **73**, 557-564.

**SCHULZ-KEY H. (1990).**

Observations on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*.

Acta Leiden. **59**, 27-44.

**SELKIRK, M.E., YAZDANBAKHS, M., FREEDMAN, D., BLAXTER, M.L., COOKSON, E., JENKINS, R.E., WILLIAMS, S.A. (1991).**

A proline-rich structural protein of the surface sheath of larval *Brugia* filarial nematode parasites.

J. Biol. Chem. **266**, 11002-8.

**SOMMER, A., RICKERT, R., FISCHER, P., STEINHART, H., WALTER, R.D., LIEBAU, E. (2003).**

A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D2.

Infect. Immun. **71**, 3603-6.

**SOUTHERN, E.M. (1975).**

Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. **98**, 503-517.

**ST. ANDRE, A., BLACKWELL, N.M., HALL, L.R., HOERAUF, A., BRATTIG, N.W., VOLKMANN, L., TAYLOR, M.J., FORD, L., HISE, A.G., LASS, J.H., DIACONU, E., PEARLMAN, E. (2002).**

A critical role for endosymbiotic *Wolbachia* bacteria and TLR4 signaling in the pathogenesis of river blindness.

Science **295**, 1892-1895.

**STEEL, C., GUINEA, A., MCCARTHY, J.S., OTTESEN, E.A. (1994).**

Long-term effect of prenatal exposure to maternal microfilaraemia on immune responsiveness to filarial parasite antigens.

Lancet **343**, 890-3.

**SUBRAHMANYAM, D. (1987).**

Antifilarials and their mode of action.

Filariasis, Ciba Foundation Symposium 127, Wiley, Chichester, 246-264.

**TANNER, M. & WEISS, N. (1981).**

*Dipetalonema viteae* (Filarioidea): development of the infective larvae in micropore chambers implanted into normal, infected and immunized jirds.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **75**, 173-4.

**TARCSA, E., ECKERSTORFER, M., BREITENBACH, M., HINTZ, M., SCHOTT, H.H., ZAHNER, H., STIRM, S. (1992).**

Epsilon-(gamma-glutamyl) lysine cross-links in *Litomosoides carinii* microfilarial sheaths.

Parasitol. Res. **78**, 623-4.

**TAUBERT, A. & ZAHNER, H. (2001).**

Cellular immune responses of filaria (*Litomosoides sigmodontis*) infected BALB/c mice detected on the level of cytokine transcription.

Parasite Immunol. **23**, 453-62.

**TAYLOR, M.J., HOERAUF, A. (2001).**

A new approach to the treatment of filariasis.

Curr. Opin. Infect. Dis. **14**, 727-31.

**THEODOROPOULOS, G., HICKS, S.J., CORFIELD, A.P., MILLER, B.G., CARRINGTON, S.D. (2001).**

The role of mucins in host-parasite interactions: Part II – helminth parasites.

TRENDS in Parasitology **17**, 130-35.

**TIJSEN, P. & KURSTAK, E. (1984).**

Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays.

Anal. Biochem. **136**, 451-457.

**TURNER, P., COPEMAN, B., GERISI, D., SPEARE, R. (1993).**

A comparison of the Og4C3 antigen capture ELISA, the Knott test, an IgG4 assay and clinical signs, in the diagnosis of Bancroftian filariasis.

Trop. Med. Parasitol. **44**, 45-8.

**UNNASCH, T.R. & WILLIAMS, S.A. (2000).**

The genomes of *Onchocerca volvulus*.

Int. J. Parasitol. **30**, 543-552.

**WAGNER, U. (1998).**

Klonierung und Charakterisierung des stadienspezifisch exprimierten ES-Proteins Juv-p-120 aus *Litomosoides sigmodontis* und ähnlicher Sequenzen aus *Brugia malayi*.

Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**WARD, D.J., NUTMAN, T.B., ZEA-FLORES, G., PORTOCARRERO, C., LUJAN, A., OTTESEN, E.A. (1988).**

Onchocerciasis and immunity in humans: enhanced T cell responsiveness to parasite antigen in putatively immune individuals.

J. Infect. Dis. **157**, 536-43.

**WEIL, G.J., CHANDRASHEKAR, R., LIFTIS, F., MCVAY, C.S., BOSSHARDT, S.C., KLEI, T.R. (1990).**

Circulating parasite antigen in *Brugia pahangi*-infected jirds.

J. Parasitol. **76**, 78-84.

**WEISS, N. (1970).**

Parasitologische und immunologische Untersuchungen über die durch *Dipetalonema viteae* erzeugte Nagetierfilariose.

Acta Trop. **27**, 219-259.

**WEISS, N. (1978).**

Studies on *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) I. Microfilaraemia in hamsters in relation to worm burden and humoral immune response.

Acta Trop. **35**, 137-50.

**WHARTON, D.A. (1980).**

Nematode egg-shells.

Parasitology **81**, 447-463.

**WHELAN, M., HARNETT, M.M., HOUSTON, K.M., PATEL, V., HARNETT, W., RIGLEY, K.P. (2000).**

A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells.

J. Immunol. **164**, 6453-60.

**WHO (1995).**

Onchocerciasis and its control.

World Health Organ. Tech. Rep. Ser. **852**, 1-103.

**WHO-Veröffentlichung (2000a).**

Eliminating Lymphatic Filariasis – Burdens and trends.

[http://www.who.int/ctd/filariasis/Disease\\_status/burdens.html](http://www.who.int/ctd/filariasis/Disease_status/burdens.html)

**WHO-Fact Sheet N°95 (2000b).**

Onchocerciasis (River Blindness).

<http://www.who.int/inf-fs/en/fact095.html>

**WILLENBUCHER, J., HOFLE, W., LUCIUS, R. (1993).**

The filarial antigens Av33/Ov33-3 show striking similarities to the major pepsin inhibitor from *Ascaris suum*.  
Mol. Biochem. Parasitol. **57**, 349-51.

**WORMS, M.J., TERRY, R.J., TERRY, A. (1961).**

*Dipetalonema witei*, filarial parasite of the jird, *Meriones libycus*. I. Maintenance in the laboratory.  
J. Parasitol. **47**, 963-970.

**YAMAOKA, K.A., KOLB, J.P., MIYASAKA, N., INUO, G., FUJITA, K. (1994).**

Purified excretory-secretory component of filarial parasite enhances Fc epsilon RII/CD23 expression on human splenic B and T cells and IgE synthesis while potentiating T-helper type 2-related cytokine generation from T cells.  
Immunology **81**, 507-12.

**YAO, S.Y., NG, A.M., VICKERS, M.F., SUNDARAM, M., CASS, C.E., BALDWIN, S.A., YOUNG, J.D. (2002).**

Functional and molecular characterisation of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation.  
J. Biol. Chem. **277**, 24938-24948.

**ZAHNER, H., & WEGERHOF, P.H. (1985).**

Immunity to *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*. I. Effect of immunization with microfilariae and existing primary infections on the parasitaemia after microfilariae injection and challenge infection.  
Z. Parasitenkd. **71**, 583-593.

**ZAHNER, H. & SCHARES, G. (1993).**

Experimental chemotherapy of filariasis: comparative evaluation of the efficacy of filaricidal compounds in *Mastomys coucha* infected with *Litomosoides carinii*, *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi* and *B. pahangi*.  
Acta Trop. **52**, 221-66.

**ZAHNER, H., HOBOM, G., STIRM, S. (1995).**

The microfilarial sheath and its proteins.  
Parasitol. Today **11**, 116-119.

**ZANG, X., ATMADJA, A.K., GRAY, P., ALLEN, J.E., GRAY, C.A., LAWRENCE, R.A., YAZDANBAKHS, M., MAIZELS, R.M. (2000).**

The serpin secreted by *Brugia malayi* microfilariae, Bm-SPN-2, elicits strong, but short-lived, immune responses in mice and humans.  
J. Immunol. **165**, 5161-9.

**ZORIO, D.A.R., CHENG, N.N., BLUMENTHAL, T., SPIETH, J. (1994).**

Operons as a common form of chromosomal organization in *C. elegans*.  
Nature **372**, 270-272.

**ERKLÄRUNG**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertaion angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten.

Nikola Pantchev

- DANKSAGUNG -

**DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Zahner danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jörg Hirzmann, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, eine große Hilfe bei größeren und kleineren Problemen im Labor war und sich meiner Fragen mit unglaublicher Geduld angenommen hat.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Tarig Dafa'alla bedanken, der ebenfalls ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir durch Ratschläge, Ideen und bei diversen Computerproblemen sehr oft half.

Bei Dr. Christian Bauer und Viktor Dyachenko möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung und die hilfreiche Diskussionen bedanken.

Weiterhin möchte ich Regina Löwenstein für die Hilfe bei den Photo-Arbeiten und Tina Scheld für das Sammeln der verschiedenen Parasitenstadien, danken.

Nicole Obermeier und Mareike Saunders möchte ich für die spaßige Zeit im Zimmer 209, die stets bekundete Anteilnahme und die sehr benötigte Aufheiterungsmaßnahmen danken.

Allen schon genannten Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie, sowie Dr. Carlos Hermosilla, Dr. Anja Taubert, Brigitte Hoffmann, Klaus Becker, Martina Hansen, Anke Sühwold und Frauke Erhorn möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und nette Zusammenarbeit danken.

Prof. Dr. Ewald Beck möchte ich für die praktische Hilfestellung bei diversen molekularbiologischen Fragestellungen danken.

Prof. Dr. Richard Lucius danke ich für die Bereitstellung von *A. viteae* infizierten Zecken.

Prof. Dr. Rolf Walter danke ich für die Überlassung von genomischer *O. volvulus*-DNA.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Dietmar Linder, Dr. Monica Linder und Dr. Sigrid Schmitt für die 2D-Gelelektrophorese und der Proteinsequenzierung bedanken.

Besonders möchte ich bei meiner Frau Alexandra bedanken, die mich immer unterstützt hat und mir in schwierigen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die es mir überhaupt ermöglicht haben zu studieren und zu promovieren und mich während der ganzen Zeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde durch den Sonderforschungsbereich 535 'Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern' der DFG, Teilprojekt A9 'Struktur, Genese und Funktion der Mikrofilarienscheide' unterstützt.



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5078-9



9 783835 950788 ©